

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus —
Der Nutzen von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturprotein 1
(NS1) in der Diagnostik

von Philipp Gird

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus —
Der Nutzen von Antikörpern gegen das Nicht-Strukturprotein 1
(NS1) in der Diagnostik

von Philipp Groll
aus München

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

Mentor: OFA Prof. Dr. Gerhard Dobler

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Die vorliegende Arbeit wurde gemäß § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in kumulativer Form verfasst.

Folgende wissenschaftliche Arbeit ist in dieser Dissertationsschrift enthalten:

P. Gírl, M. Bestehorn-Willmann, S. Zange, J. Borde, G. Dobler, H. von Buttlar

Tick-borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Tick-borne encephalitis virus (TBEV)	3
1.1.	Geschichte.....	3
1.2.	Systematik	4
1.3.	Virusaufbau und Genom	5
1.3.1.	Nichtstrukturprotein NS1	7
1.4.	Weitere Nichtstrukturproteine	10
1.5.	Übertragung.....	11
1.6.	Epidemiologie.....	14
2.	Klinik und Pathogenese.....	15
2.1.	TBE beim Menschen.....	16
2.2.	TBE beim Pferd.....	17
2.3.	TBE beim Hund.....	18
2.4.	TBE bei Nutztieren	19
2.5.	TBE bei Wildtieren.....	20
2.5.1.	TBE bei Kleinsäugetern	21
2.5.2.	TBE bei Vögeln	22
3.	Diagnostik	22
3.1.	Differentialdiagnostik.....	22
3.2.	Weiterführende Diagnostik.....	23
3.3.	Spezifische Labordiagnostik	24
3.3.1.	Direkter Virusnachweis	24
3.3.2.	Indirekter Virusnachweis	25
3.3.2.1.	Komplementbindungsreaktion	26
3.3.2.2.	Hämagglutinationshemmtest	26
3.3.2.3.	Neutralisationstest.....	27
3.3.2.4.	Immunfluoreszenztest.....	28
3.3.2.5.	ELISA	28
3.3.3.	Diagnostische Limitationen	29
3.3.3.1.	Persistierende IgM-Antikörper	29
3.3.3.2.	Kreuzreaktionen.....	30

4.	Therapie und Prävention	30
4.1.	Therapie	30
4.2.	Expositionsprophylaxe	31
4.3.	Impfprophylaxe	31
4.4.	Impfversagen.....	33
4.4.1.	Klinisches Impfversagen	34
4.4.2.	Serologisches Impfversagen	34
4.4.3.	Impfdurchbruch	34
III.	ZIELE.....	37
IV.	PUBLIKATION.....	38
V.	DISKUSSION UND AUSBLICK	59
1.	Diskussion	59
2.	Ausblick	68
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	70
VII.	SUMMARY	71
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	73
IX.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103
X.	ANHANG	105
XI.	DANKSAGUNG.....	111

I. EINLEITUNG

Das Virus der Frühsommer Meningoenzephalitis (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) verursacht zum Teil schwere, generalisierte Infektionen mit Beteiligung des Zentralnervensystems (ZNS) und ist derzeit mit ca. 10.000 - 12.000 humanen Fällen pro Jahr die wichtigste, durch Vektoren übertragene, Virusinfektion Europas.

Im Deutschen wird das Frühsommer Meningoenzephalitis-Virus (FSME-Virus) häufig mit dem TBEV gleichgesetzt, beschreibt aber eigentlich nur den Europäischen Subtypen (Rubel and Schiffner-Rohe, 2019). Im Folgenden wird daher die international übliche Nomenklatur, TBEV, verwendet.

Auch diverse Säugetiere sind empfänglich für das TBEV. In der Literatur finden sich entsprechende Berichte über TBEV-Infektionen auch bei Hunden, Pferden, Ziegen und verschiedenen Wildtieren. Vor allem bei Hunden und Pferden scheinen sich TBEV-Infektionen auch klinisch zu manifestieren.

Verbreitung und Bedeutung der Frühsommer Meningoenzephalitis (FSME; Tick-borne encephalitis, TBE) bei Tieren sind aber noch weitgehend unklar, dürfte aber weitgehend der Erkrankung des Menschen entsprechen.

Derzeit ist eine spezifische Therapie der TBE nicht möglich, Schutz bietet aber die aktive Immunisierung mit Totimpfstoffen. Während die Impfung effektiv vor einer TBE Erkrankung schützt, erschwert sie gleichzeitig Diagnostik und epidemiologische Untersuchungen über natürliche Infektionen. Die Diagnostik stützt sich bislang hauptsächlich auf den Nachweis spezifischer Antikörper gegen die TBEV-Strukturproteine. Entsprechende Testsysteme enthalten dabei in der Regel TBE-Vollvirus (whole virus, WV), das auch in den verfügbaren Totimpfstoffen enthalten ist. TBE-Patienten wie Impflinge bilden folglich gleichermaßen Antikörper gegen die Strukturproteine.

Die Bildung neutralisierender Antikörper im Patienten richtet sich hauptsächlich gegen das Hüllprotein E (envelope protein).

Inwieweit für die Antikörperentwicklung auch die beiden anderen

Strukturproteine, C und M, von Bedeutung sind, ist noch weitgehend unklar. Vor allem bei enger zeitlicher Korrelation zwischen erstmaliger Impfung und echter Infektion ist eine Unterscheidung der Immunantwort nahezu unmöglich.

Ein neuer Ansatz beruht auf der Detektion von Antikörpern gegen das TBEV-Nicht-Strukturprotein 1 (NS1). NS1 wird nur während der Virusreplikation im Zuge einer echten Infektion gebildet, ist aber nicht in den verfügbaren Totimpfstoffen enthalten. Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen NS1 ist somit beweisend für das Vorliegen einer akuten oder zurückliegenden TBEV-Infektion des Patienten. Damit wird erstmals seit Einführung der TBE-Impfung eine Unterscheidung von Impf- und Infektionsantikörpern möglich. Dies ermöglicht nun Untersuchungen zur Prävalenz der TBE, auch in Bevölkerungen mit hohen Durchimpfungsraten wie beispielsweise in Österreich.

Ziel dieser Arbeit war es, einen NS1 basierten ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) zur Detektion von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern gegen das TBEV zu entwickeln und diesen nach den Anforderungen der europäischen Norm DIN EN ISO 15189 für die Verwendung in akkreditierten Diagnostiklabors zu validieren. Hier sollte vor allem die Unterscheidbarkeit von Antikörpern nach TBE-Impfung von Antikörpern nach TBEV-Infektion bewiesen werden. Außerdem sollten mögliche Kreuzreaktionen mit anderen wichtigen humanpathogenen Flaviviren, wie beispielsweise dem Gelbfieber-Virus (Yellow fever virus, YFV), dem West-Nile-Virus (WNV) oder den Dengue-Virustypen (DENV), abgeklärt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Tick-borne encephalitis virus (TBEV)

1.1. Geschichte

TBE als Krankheitsbild wurde erstmals durch den österreichischen Primararzt des damaligen Bezirkskrankenhauses der Bezirksstadt Neunkirchen, ca. 50 km südlich von Wien, Dr. Johann (Hans) Schneider im Jahr 1931 als akute epidemische seröse Meningitis beschrieben (Schneider, 1931; Dumpis *et al.*, 1999). Ein Jahr später folgte eine umfassende Monographie seiner Beobachtungen, in der er mehr als 60 FSME-Fälle klinisch beschrieb (Schneider, 1932). Sechs Jahre später (1937) gelang sowjetischen Wissenschaftlern um Zilber schließlich der Nachweis der Krankheitsursache, ein Virus, das durch Zecken der Art *Ixodes persulcatus* übertragen wird (Dumpis *et al.*, 1999). Ein Jahr später, 1938, entsandte das Gesundheitsministerium der UdSSR unter Leitung von Pavlovsky eine Expedition mit dem Ziel, die Übertragungswege, natürlichen Reservoir und die beteiligten Wirte des verursachenden Erregers (damals Virus der Russischen Frühjahr-Sommer-Enzephalitis, RSSE) aufzuklären. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Expedition entwickelte Pavlovsky schließlich sein berühmtes Konzept „The Natural Nidality of Transmissible Diseases“ (Die natürliche Herdstruktur übertragbarer Krankheiten), ein Konzept, das bis heute Bestand hat: Zecken infizieren sich während einer Blutmahlzeit bei einem infizierten Wirt; das Virus bleibt in den Zecken über alle Entwicklungsstadien erhalten und wird bei den nächsten Blutmahlzeiten auf neue Wirte übertragen; auch sogenannte Reservoir-Wirte werden entsprechend durch Zecken infiziert und übertragen das Virus ihrerseits während des Saugaktes auf neue Zecken (Pavlovsky, 1939, 1966; Dobler *et al.*, 2018).

1.2. Systematik

Das TBEV gehört zur Gattung *Flavivirus*, die, zusammen mit den Gattungen *Pestivirus* und *Hepacivirus*, die Familie der *Flaviviridae* bildet (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), n.d.; Chambers *et al.*, 1990; Modrow *et al.*, 2010; Simmonds *et al.*, 2017). Ihren Namen hat diese Virusfamilie von ihrer Typspezies, dem Gelbfieber-Virus (lateinisch „flavus“ – gelb). Die Gattung *Flavivirus* enthält neben dem TBEV und dem Gelbfieber-Virus viele weitere human- und tierpathogene Erreger wie West-Nile-, Dengue-, Japanese-Encephalitis- oder Zika-Virus (Lindquist and Vapalahti, 2008). Aufgrund ihrer Übertragung durch Zecken oder Mücken werden viele Flaviviren, darunter das TBEV, auch als Arboviren (arthropod-borne viruses) bezeichnet (Modrow *et al.*, 2010).

Derzeit gibt es drei anerkannte genetische Subtypen des TBEV: Den Europäischen (TBEV-EU), den Sibirischen (TBEV-Sib) und den Fernöstlichen (TBEV-FE) Subtypen (Lindquist and Vapalahti, 2008; Süss, 2011; Tkachev *et al.*, 2011). Außerdem wird die Einführung von zwei weiteren Subtypen, dem Baikal-Subtyp (TBEV-Bkl) und dem Himalaya-Subtypen (TBEV-Him), vorgeschlagen (Kovalev and Mukhacheva, 2017; Dai *et al.*, 2018).

1.3. Virusaufbau und Genom

TBE-Viren sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Das Genom hat eine Größe von ca. 11 Kilobasen (kb) und liegt als einzelsträngige RNA positiver Polarität [ss(+)RNA] vor (Deubel *et al.*, 1983; Lindquist and Vapalahti, 2008). Durch die positive Polarität fungiert das RNA-Genom als direkt infektiöse Messenger-RNA (mRNA), die als offener Leserahmen (Open-Reading-Frame, ORF) für ein Polyprotein codiert (Brinton, 1986; Chambers *et al.*, 1990; Lindquist and Vapalahti, 2008). Posttranslational erfolgt dann, durch zelluläre und virale Proteasen, die Spaltung in die drei Strukturproteine C (Capsid), E (Envelope) und prM (precursor of Membrane) sowie sieben Nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Rice *et al.*, 1985, 1986; Westaway, 1987).

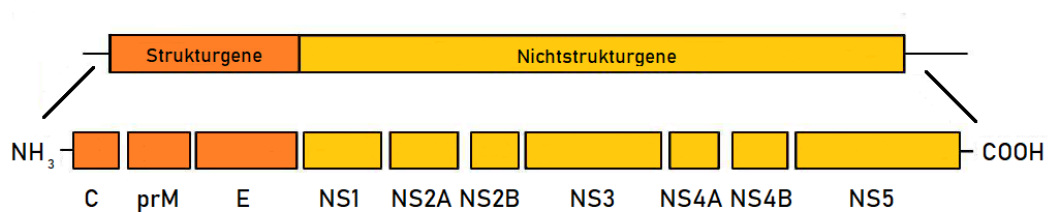


Abbildung 1

Schematische Darstellung des kodierenden Abschnittes eines TBEV-Genoms mit Darstellung der einzelnen Genomabschnitte für die Strukturproteine (C, prM, E) und Nichtstrukturproteine (NS1 – NS5). [Darstellung angelehnt an Knipe *et al.* 2007]

Das C-Protein ist Baustein der ikosaedrischen Kapsidstruktur, an deren Innenseite das virale Genom assoziiert ist. Genom und Kapsid bilden zusammen das Nukleokapsid. Nach außen schließt sich eine doppelschichtige Hüllmembran an, in die die beiden Proteine M (Membran) und E (Envelope) eingelagert sind (Chambers *et al.*, 1990; Labuda and Nuttall, 2004; Modrow *et al.*, 2010).

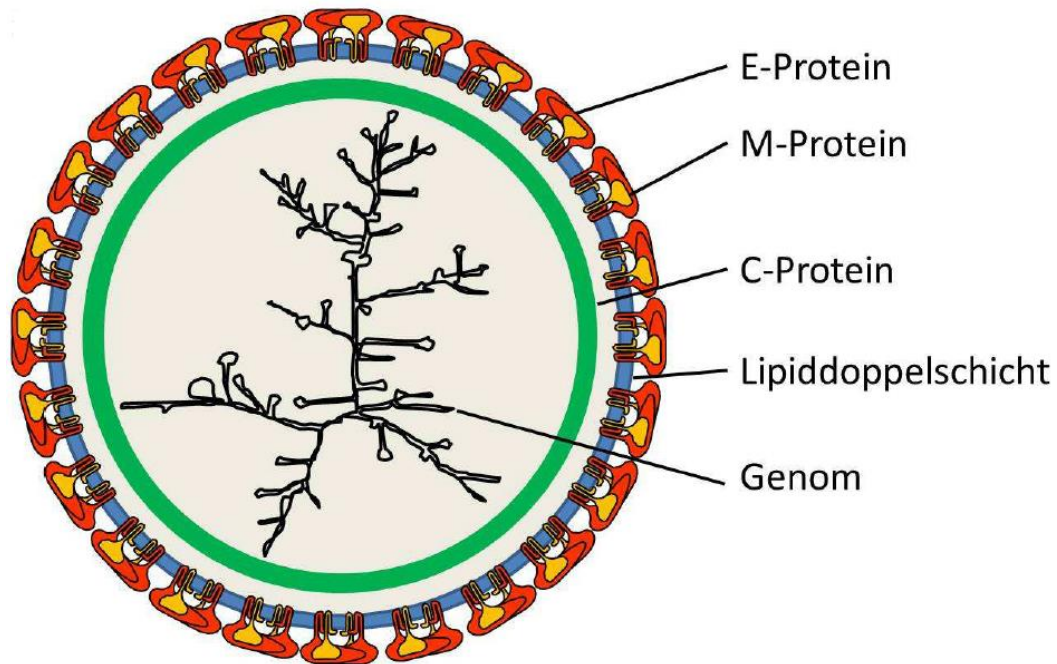


Abbildung 2

Aufbaus eines Flavivirus. In die Lipiddoppelschicht (blau) sind die Strukturproteine E und M eingelagert. Nach innen schließt sich das Kapsid (grün) an, das sich zusammen mit dem viralen Genom zum Nukleokapsid vereint. [Quelle: (Frey, 2004)]

Dabei ist das E-Protein in zweierlei Hinsicht von besonderer Bedeutung: Zum einen vermittelt es die Adsorption des Viruspartikels an die Wirtszelle sowie die anschließende Fusion (Gritsun *et al.*, 2003; Fritz *et al.*, 2011). Zum anderen stellt es als Immunogen das wichtigste Angriffsziel der Immunantwort im Wirt dar und erlaubt die Bildung neutralisierender Antikörper (Brinton, 1986; Heinz, 1986; Chambers *et al.*, 1990).

Die Nicht-Strukturproteine haben diverse Funktionen im Rahmen der viralen Replikation, über die derzeit aber noch relativ wenig bekannt ist (Chambers *et al.*, 1990; Muller and Young, 2013; Xie *et al.*, 2013; Shi, 2014; Barrows *et al.*, 2018).

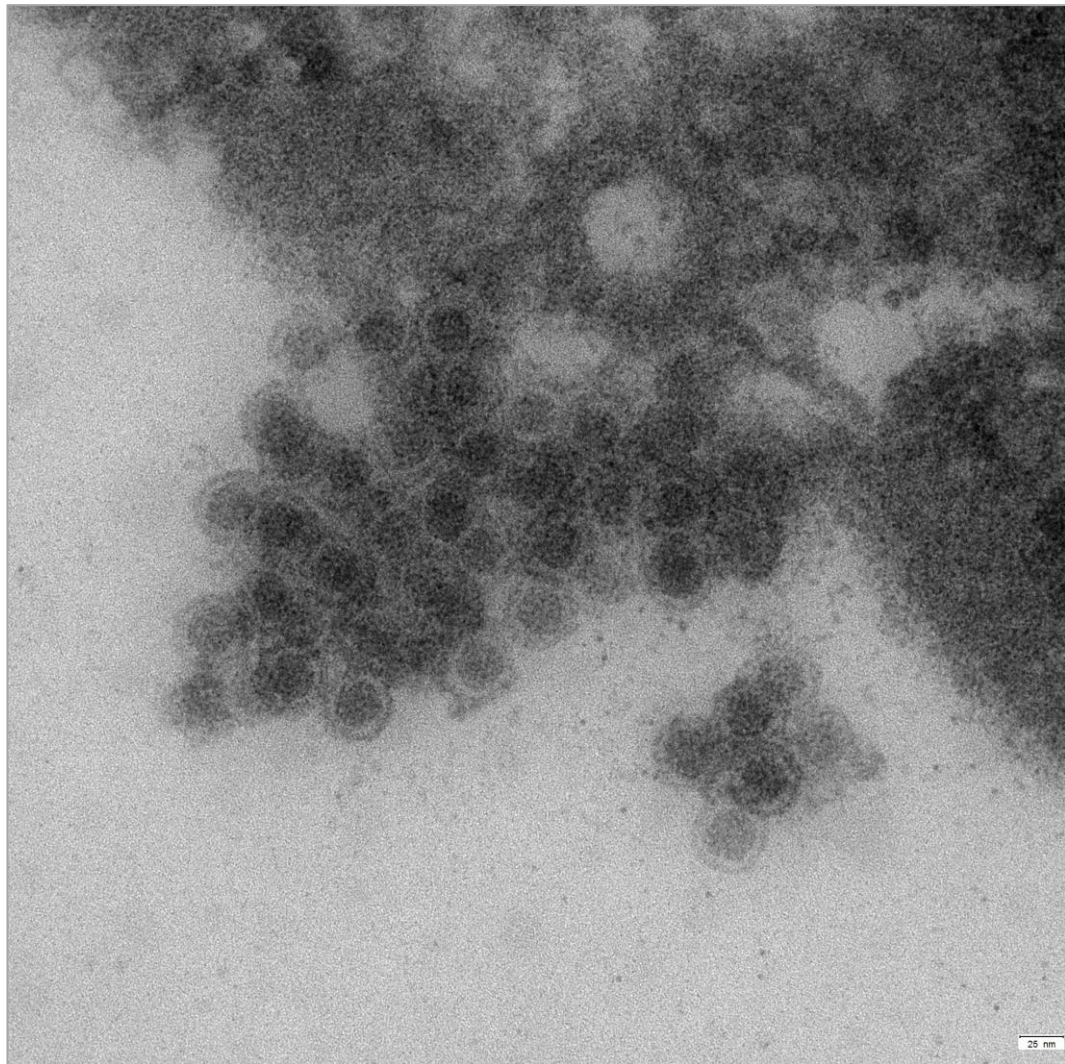


Abbildung 3

Elektronenmikroskopische Darstellung von FSME Viren (Stamm AS 33) im intrazellulären Raum von VeroB4 Zellen, 4 Tage post infectionem; [Foto: PD Dr. Eßbauer, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr]

1.3.1. Nichtstrukturprotein NS1

Das NS1 Protein ist ein Glycoprotein, das aus 352 Aminosäuren aufgebaut ist, mit einem Molekulargewicht von 46-55 kDa, abhängig von seinem jeweiligen Glycosylierungszustand (Smith and Wright, 1985; Gould *et al.*, 1986; Stephenson *et al.*, 1987; Muller and Young, 2013). NS1 ist das am stärksten konservierte Protein der Flaviviren und zeigt einen hohen Grad an Homologie zwischen den einzelnen Vertretern (Jacobs *et al.*, 1992; Venugopal *et al.*, 1994; Song *et al.*, 2016). Es findet sich sowohl intra- als auch extrazellulär und kommt dabei in Form unterschiedlicher Oligomere

vor: Nach der Spaltung des ursprünglichen Polyproteins verbleiben NS1 Monomere zur weiteren Modifikation in der Zelle. Diese lagern sich bereits nach 20-40 Minuten zu stabilen Dimeren zusammen und finden sich dann im Zytoplasma oder gebunden an die Zellmembran. Dort interagiert NS1 mit Proteinen der Wirtszelle sowie der viralen RNA und spielt so eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation, die genauen Mechanismen sind bislang jedoch nicht abschließend geklärt (Westaway, 1987; Winkler *et al.*, 1988; Mackenzie *et al.*, 1996; Lindenbach and Rice, 1997; Jacobs *et al.*, 2000; Muller and Young, 2013; Cervantes-Salazar *et al.*, 2015). Extrazellulär erscheint NS1 als Dimer gebunden auf der Zelloberfläche und als freies Lipoprotein sezerniert in Form eines Hexamers (Winkler *et al.*, 1988; Fan and Mason, 1990; Bressanelli *et al.*, 2004; Gutsche *et al.*, 2011; Muller and Young, 2013). Die beiden extrazellulären Formen haben stark immunogene Wirkung und führen zu einer schützenden Immunantwort mit Bildung spezifischer Antikörper (Gould *et al.*, 1986; Schlesinger *et al.*, 1986, 1987). Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass extrazelluläres NS1 das Krankheitsgeschehen maßgeblich beeinflusst: So interagiert freies NS1 direkt mit verschiedenen Zellen des Wirtsorganismus (Falconar, 1997; Chang *et al.*, 2002; Avirutnan *et al.*, 2006, 2007), aktiviert Toll-like Rezeptoren (TLRs) (Chen *et al.*, 2015) und wirkt inhibierend auf das Komplementsystem (Avirutnan *et al.*, 2011; Rastogi *et al.*, 2016). Zunehmende Bedeutung erfährt NS1 auch als diagnostischer Marker. So kann freies NS1 Protein während der frühen Krankheitsphase bei einigen Flavivirus-Infektionen (z.B. DENV) direkt im Patientenserum nachgewiesen werden (Young *et al.*, 2000; Alcon *et al.*, 2002; Libraty *et al.*, 2002). Aber auch der Nachweis spezifischer Antikörper gegen NS1 gewinnt mehr und mehr an Bedeutung (Steinhagen *et al.*, 2016; Balmaseda *et al.*, 2017; Albinsson *et al.*, 2018).

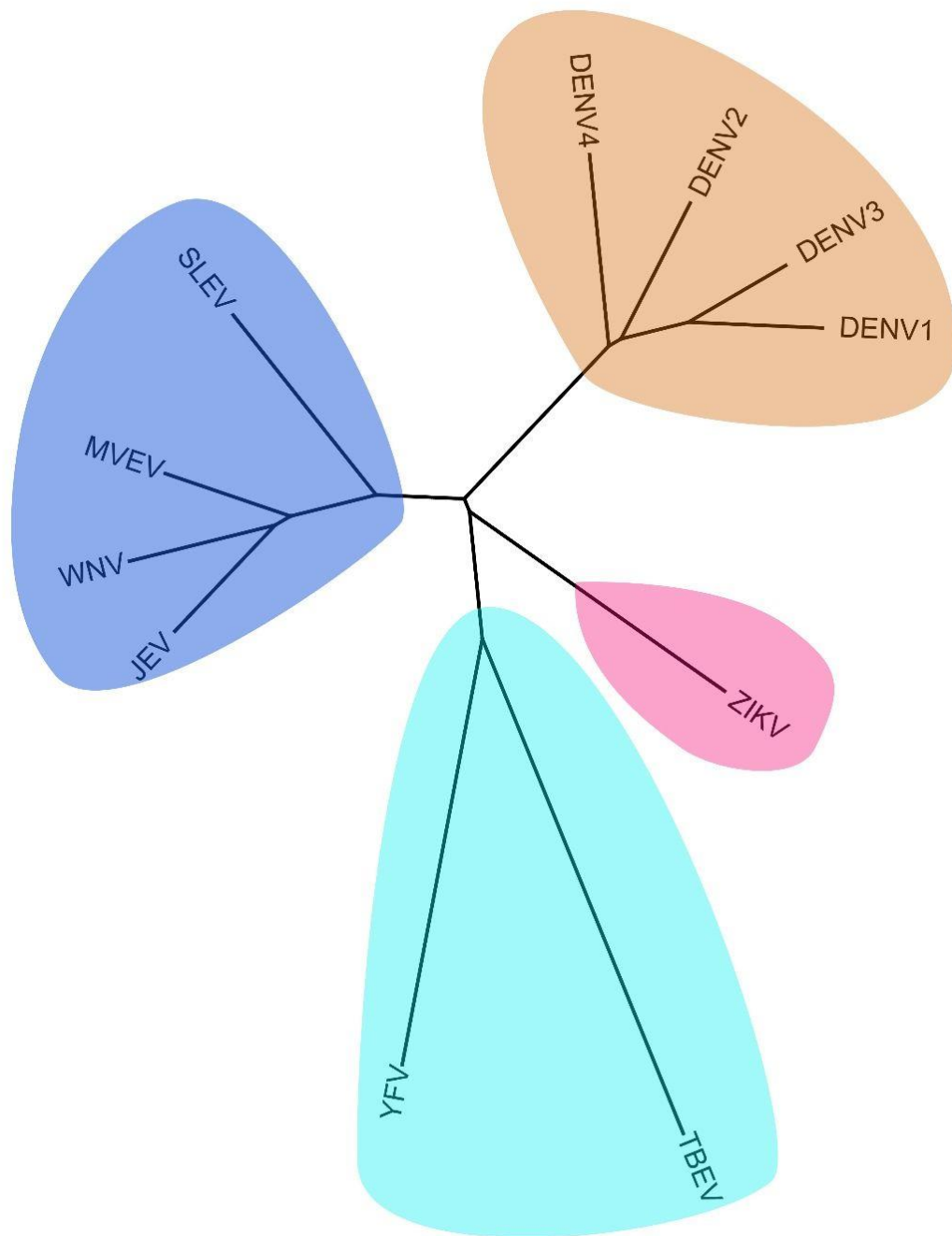


Abbildung 4

Phylogenetische Verwandtschaftsanalyse 11 verschiedenerer Flaviviren anhand ihrer NS1-Proteinsequenz. (Song *et al.*, 2016)

1.4. Weitere Nichtstrukturproteine

Die Funktion des NS2A ist bislang weitgehend unklar. Es wird vermutet, dass es bei der Bildung des sogenannten Replikationskomplexes beteiligt ist (Lindenbach and Rice, 2003). NS2B ist ein kleines membran-assoziiertes Protein, das als wesentlicher Kofaktor an der Proteaseaktivität des NS3 fungiert (Chambers *et al.*, 1993; Lindenbach and Rice, 2003; Dobler *et al.*, 2018). Das NS3 spielt durch seine Funktion als Serinprotease, Helicase und Nucleosid-Triphosphatase eine bedeutende Rolle im Zuge der Virusreplikation und der posttranslationalen Modifikation des viralen Polyproteins (Lindenbach and Rice, 2003). Dabei spaltet NS3 die Peptidbindungen zwischen NS2A und NS2B, NS2B und NS3, NS3 und NS4A sowie NS4B und NS5 (Lin *et al.*, 1993; Amberg *et al.*, 1994; Yamshchikov and Compans, 1994; Lindenbach and Rice, 2003). NS3 stellt durch seine zentrale Rolle bei der Virusreplikation auch ein mögliches Angriffsziel für antivirale Therapien dar (Singh and Somvanshi, 2009; Bollati *et al.*, 2010; Dobler *et al.*, 2018). NS4A scheint ebenfalls Teil des Replikationskomplexes zu sein; zusammen mit NS4B wirkt es außerdem als Inhibitor der Interferon- (IFN) Signalübertragung (Uchil and Satchidanandam, 2003; Munoz-Jordan *et al.*, 2005; Dobler *et al.*, 2018). NS5 ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Es ist das größte Protein der Flaviviren und, wie das NS1-Protein, stark konserviert (Munoz-Jordan *et al.*, 2005). NS5 komplexiert darüber hinaus mit NS3 und stimuliert dadurch dessen RNA-Nucleosidtriphosphatase-Aktivität (Lindenbach and Rice, 2003; Černý *et al.*, 2014; Dobler *et al.*, 2018).

1.5. Übertragung

Die Übertragung des TBEV erfolgt hauptsächlich über den Stich infizierter Zecken als Vektor. Wichtigster Überträger des Europäischen Subtypen ist der Gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*), während der Sibirische und Fernöstliche Subtyp vor allem durch die Taigazecke (*Ixodes persulcatus*) übertragen wird (Allison *et al.*, 1999; Gaunt *et al.*, 2001; Lundkvist *et al.*, 2001; Mizutani *et al.*, 2001).



Abbildung 5

Links: *Ixodes persulcatus* (Weibchen).

Rechts: *Ixodes ricinus* (Weibchen).

[Fotos: Dr. Chitimia-Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr]

Vereinzelt wurde TBEV auch in Zecken der Arten *Haemaphysalis* und *Dermacentor* nachgewiesen, ihre Rolle als Vektor in der Aufrechterhaltung des natürlichen Übertragungszyklus und als Überträger des TBEV auf den Menschen sind aber noch unklar (Dobler *et al.*, 2012; Chitimia-Dobler *et al.*, 2019). Zecken nehmen das Virus in der Regel über das Blut infizierter Wirtstiere auf. Bei gleichzeitigem Blutsaugen mehrerer Zecken auf dem gleichen Wirt in enger Nachbarschaft, sogenanntem Co-feeding, kann ebenfalls Virus zwischen den Zecken übertragen werden; diese Form der Übertragung ist experimentell auch bei TBEV-immunen Tieren gezeigt worden, eine Virämie des Wirtes ist dabei nicht erforderlich (Labuda *et al.*, 1997; Lindquist and Vapalahti, 2008; Randolph, 2011). Im weiteren Verlauf infiziert das Virus die Speicheldrüsen der Zecken und wird mit dem

Zeckenspeichel bei der nächsten Blutmahlzeit auf einen neuen Wirt übertragen (Dobler *et al.*, 2012). Schon mit Beginn des Saugaktes wird Virus mit dem Speichel ausgeschieden, sodass eine Infektion bereits nach sehr kurzen Saugzeiten möglich ist. Auch ohne einen Wirt als Zwischenschritt kann TBEV zwischen Zecken übertragen werden. Einmal infiziert wird das Virus während der Zeckenentwicklung häufig von einem Stadium zum nächsten (transstadiale Übertragung) weitergegeben (Nosek and Grulich, 1967). Zudem ist die Virusübertragung von weiblichen Zecken auf ihre Eier (transovariable Übertragung) beschrieben (Danielová and Holubová, 1991). Ein weiterer Übertragungsweg für die Infektion beim Menschen ist die alimentäre Infektionen durch den Verzehr virushaltiger Rohmilch (Schaf-, Ziegen- oder Kuhmilch) bzw. roher Milchprodukte (Holzmann *et al.*, 2009; Cains *et al.*, 2012; Dorko *et al.*, 2018). Vereinzelt wird auch von Laborinfektionen berichtet, diese sind durch die Einführung moderner Sicherheitswerkbänke und der TBE-Impfung heute aber sehr selten (Avšič-Županc *et al.*, 1995; Dobler *et al.*, 2012).

1.6. Epidemiologie

Die TBE kommt von Zentral-, Nord- und Osteuropa über Russland, die Mongolei, Nordchina und den Fernen Osten Russlands bis nach Japan vor (Dumpis *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2008; Mantke *et al.*, 2008; Valarcher *et al.*, 2015). In diesen Gebieten kommt das Virus jedoch nicht flächendeckend vor, sondern konzentriert sich auf räumlich eng begrenzte Areale, sogenannte endemische Foci (Dobler *et al.*, 2012). Durch diese inhomogene Virusverteilung innerhalb der Endemiegebiete variiert das Risiko einer TBEV Infektion nach einem Zeckenstich - je nach Ort des Zeckenstiches - zwischen 1/200 und 1/1000 (Süss, 2003; Valarcher *et al.*, 2015). Über die letzten Jahre konnten steigende Fallzahlen und eine zunehmende Ausweitung der endemischen Gebiete beobachtet werden (Mantke *et al.*, 2008; Valarcher *et al.*, 2015), ein Trend der sich weiter fortsetzen wird (Dobler *et al.*, 2012). Aktuell treten weltweit ca. 10.000 – 12.000 humane TBE-Fälle pro Jahr auf (Zavadska *et al.*, 2013; Valarcher *et al.*, 2015), davon alleine in Europa mehr als 3.000 Fälle verbunden mit einem Krankenhausaufenthalt (Lindquist and Vapalahti, 2008; Valarcher *et al.*, 2015). Eine einheitliche Überwachungsstrategie im Verbreitungsgebiet gibt es bislang nicht, in Deutschland und 15 weiteren EU-Mitgliedsstaaten ist die TBE allerdings als meldepflichtige Infektionskrankheit gelistet (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2012; Valarcher *et al.*, 2015). Dennoch wird vermutlich die große Masse der TBE-Infektionen derzeit nicht erfasst, da häufig nur unspezifische, grippeähnliche Symptome auftreten, die zu keiner weiteren Diagnostik veranlassen. Schätzungen zufolge liegt der Anteil an subklinischen Infektionen bei 70 bis 98% (Gustafson *et al.*, 1992; Dumpis *et al.*, 1999).



Abbildung 7

TBEV-Risikogebiete. Rot schraffiert sind Gebiete mit dokumentierten TBE-Fällen und/oder TBEV-Isolation (Dobler *et al.*, 2019).

2. Klinik und Pathogenese

Nach dem Zeckenstich erfolgt die Virusvermehrung zunächst lokal in Hautzellen, später auch in Langerhans-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Lymphozyten an der Einstichstelle (Labuda *et al.*, 1996; Valarcher *et al.*, 2015). Als erste Immunreaktion auf die Infektion wandern dendritische Zellen (DC) in das infizierte Hautareal ein, werden dort mit dem Virus infiziert und verschleppen es damit über die Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten (Valarcher *et al.*, 2015; Kaiser, 2016). Ähnlich verläuft auch die Infektion über virushaltige Milch; hier erfolgt die erste Vermehrung in den Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes bevor wiederum DC den Transport zu den Lymphknoten übernehmen (Dörrbecker *et al.*, 2010; Valarcher *et al.*, 2015). In den regionalen Lymphknoten folgt eine zweite Replikationsphase, wiederum in DC, Makrophagen und möglicherweise auch T-Lymphozyten, die in einer Virämie resultiert und zur Infektion weiterer Organe - vor allem Leber, Milz und Thymus - führt (Leonova and Maistrovskaia, 1996; Dörrbecker *et al.*, 2010; Valarcher *et al.*,

2015). Wie genau das Virus im weiteren Verlauf die Blut-Hirn-Schranke überwindet ist bisher noch unklar, es scheinen aber hohe Virustiter nötig zu sein (Haglund and Günther, 2003; Valarcher *et al.*, 2015; Dobler *et al.*, 2018). Im ZNS angekommen, sind die Epithelzellen der Hirnhäute, die Purkinje-Zellen im Kleinhirn sowie die motorischen Kerne in Hirnstamm und Rückenmark Ziel der TBEV. Die Infektion führt über direkte Virusschädigung und indirekt über immunologische Vorgänge zur Lyse und damit zur Zerstörung der befallenen Zellen, was die zum Teil schwere Symptomatik und den hohen Anteil an Residuen erklärt (Dumpis *et al.*, 1999; Gelpi *et al.*, 2006; Růžek *et al.*, 2009, 2010; Kaiser, 2016).

2.1. TBE beim Menschen

Serologische Studien deuten darauf hin, dass 70 bis 95% der humanen TBEV Infektionen subklinisch oder asymptomatisch verlaufen (Shapoval, 1977; Gustafson *et al.*, 1992; Dumpis *et al.*, 1999; Donoso-Mantke *et al.*, 2011). Klinische Symptome können in allen Altersklassen auftreten, bei Erwachsenen und älteren Menschen sind schwere Verlaufsformen jedoch häufiger (Lindquist and Vapalahti, 2008; Studahl *et al.*, 2013; Valarcher *et al.*, 2015). In einer retrospektiven Untersuchung aus Polen wurden beispielweise in den Jahren 1993 bis 2008 710 TBE-Patienten untersucht, die aufgrund schwerer Symptomatik in ein Krankenhaus eingeliefert wurden; 33% dieser Patienten waren älter als 50 Jahre (Czupryna *et al.*, 2011). Auch weitere epidemiologische Studien in Europa ergaben unter den TBE-Erkrankten einen Anteil älterer Patienten (≥ 50 Jahre) von über 50% (Dobler *et al.*, 2018). Die Inkubationszeit der TBE nach dem Zeckenstich liegt bei durchschnittlich acht Tagen, wobei Spannen von zwei bis 28 Tagen beschrieben werden (Kaiser, 1999; Lindquist and Vapalahti, 2008). Bei rund einem Drittel der Infizierten bleibt der Zeckenstich unbemerkt (Kaiser, 1999; Mickienė *et al.*, 2002; Lindquist and Vapalahti, 2008). Typisch für Infektionen mit dem europäischen TBEV Subtypen ist ein biphasischer Krankheitsverlauf. (Günther *et al.*, 1997; Kaiser, 1999). Bei ca. 70% der Infizierten tritt nach der Inkubationszeit eine erste Krankheitsphase von durchschnittlich fünf Tagen (zwei bis zehn) auf, geprägt von unspezifischen, grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, katarrhalischen und gastrointestinalen Beschwerden (Kaiser, 1999; Lindquist and

Vapalahti, 2008). Auf eine symptomfreie Zeit von ein bis 21 Tagen folgt bei einem Drittel der Patienten eine zweite Krankheitsphase unter Beteiligung des ZNS, mit hohem Fieber, Meningitis (in ca. 50% der Fälle), Meningoenzephalitis (ca. 40%) und Myelitis (ca. 10%) (Kaiser, 1999; Lindquist and Vapalahti, 2008; Valarcher *et al.*, 2015). Auch in der zweiten Phase ist die Symptomatik ohne weitere mikrobiologische Diagnostik nicht von anderen Meningitis-Formen zu unterscheiden (Gustafson *et al.*, 1992; Dumpis *et al.*, 1999; Kaiser, 2016). Retrospektive Studien ergaben in 1 bis 2% der Fälle einen tödlichen Krankheitsverlauf und bei bis zu 6,8% der Patienten anhaltende Paraplegie (Lindquist and Vapalahti, 2008; Bogovic, 2015). Prospektive Untersuchungen zu den Langzeitfolgen der TBE beschrieben bei 26 bis 48% der beobachteten Patienten auch noch nach sechs bis acht Monaten anhaltende Symptome (Günther *et al.*, 1997; Mickienė *et al.*, 2002; Lindquist and Vapalahti, 2008). Unter neurologischen Dysfunktionen mit schwerer Beeinträchtigung der Lebensqualität litten 30% der Patienten (Mickienė *et al.*, 2002). In einer weiteren retrospektiven Studie aus Schweden wurden 114 Patienten im Schnitt über 4 Jahre begleitet, auch hier zeigten 28% der Patienten moderate bis schwere Langzeitfolgen (Haglund *et al.*, 1996). Somit scheinen Symptome, die auch nach einem Jahr noch vorliegen, eine schlechte Prognose zu haben (Lindquist and Vapalahti, 2008).

2.2. TBE beim Pferd

Die erste TBE-Fallbeschreibung bei einem Pferd in der Schweiz wurde bereits im Jahr 1981 veröffentlicht (Waldvogel *et al.*, 1981), dennoch ist nur wenig über die Verbreitung und den Einfluss der TBE in Pferdepopulationen bekannt. Bisher gibt es lediglich vier publizierte Studien (die erste Fallbeschreibung von 1981 miteingeschlossen) in denen TBEV ursächlich einer Erkrankung mit neurologischer Symptomatik beim Pferd zugeordnet werden konnte (Dobler *et al.*, 2018), davon zwei Berichte aus Deutschland (Müller *et al.*, 2006; Klaus *et al.*, 2013) und einer aus Österreich (Luckschander *et al.*, 1999). Betroffene Pferde zeigen eine ganze Bandbreite neurologischer Symptome wie Ataxie, Nervosität, Mydriasis, Apathie, bis zu tonisch-klonischen Krämpfen und reduziertem Bewusstsein und Festliegen (Dobler *et al.*, 2018). Festliegende Pferde haben eine

schlechte Prognose, in leichteren Fällen ist eine vollständige Rekonvaleszenz, zum Teil mit leichten Residuen, aber möglich (Klaus *et al.*, 2013). Auch bezüglich der Seroprävalenz sind nur vereinzelte Untersuchungen publiziert. Die Prävalenz reicht demnach von 26,1% bzw. 13% in Österreich (Luckschander *et al.*, 1999; Rushton *et al.*, 2013) über 5,2% bzw. 23,4% in Süddeutschland (Janitza-Futterer, 2003; Klaus *et al.*, 2013) bis hin zu 0% in Ungarn und Tschechien (Šikutová *et al.*, n.d.; Sedlak *et al.*, 2014). Allerdings könnten diese Zahlen auch durch Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren beeinflusst sein (Sedlak *et al.*, 2014; Cleton *et al.*, 2017; Dobler *et al.*, 2018).

2.3. TBE beim Hund

Hunde haben aufgrund ihrer geringeren Körpergröße und ihres Erkundungsverhaltens am Boden ein im Vergleich zum Menschen 50 bis 100-fach höheres Risiko mit TBEV infizierten Zecken in Kontakt zu kommen (Pfeffer and Dobler, 2011). Entsprechend häufig sind TBEV-Infektionen bei Hunden in endemischen Gebieten. Für einige Länder wurden serologische Studien durchgeführt, in denen sich Prävalenzraten zwischen 0,1 und 42,7% ergaben (Dobler *et al.*, 2018): Schweiz 3,6 bis 5,9% (Matile *et al.*, 1981), Griechenland 1 bis 8% (Chambouris *et al.*, 1989), Deutschland 2,1 bis 42,7% (Reiner *et al.*, 2002; Balling *et al.*, 2015), Belgien 0,1% (Roelandt *et al.*, 2011), Dänemark 4,8 bis 30% (Lindhe *et al.*, 2009), Tschechien 3,3 bis 11,3% (Klimeš *et al.*, 2001; Hekrlová *et al.*, 2015), Norwegen 16,4% (Csángó *et al.*, 2004), Finnland 6 bis 40% (Levanov *et al.*, 2016) und in Österreich 13,3 bis 24% (Kirtz *et al.*, 2003; Leschnik *et al.*, 2013). Trotz der zum Teil hohen Seroprävalenz manifestiert sich die Erkrankung bei Hunden nur selten klinisch (Dobler *et al.*, 2018). Treten jedoch klinische Symptome auf, nimmt die Erkrankung einen zumeist schweren Verlauf und endet in bis zu 50% der Fälle tödlich (Pfeffer and Dobler, 2011; Dobler *et al.*, 2018). Bei Hunden wird eine Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen angenommen, genaue Werte sind schwer festzulegen, da TBE bei Hunden nur selten diagnostisch aufgeklärt wird und auch experimentell infizierte Hunde überwiegend keine Klinik entwickeln (Gresikova *et al.*, 1972; Pfeffer and Dobler, 2011). Häufig zeigen betroffene Hunde eine deutlich erhöhte Körpertemperatur von bis zu 41,4°C und Wesensänderungen wie erhöhte

Aggressivität, Nervosität, Anorexie oder Apathie (Klimeš *et al.*, 2001; Pfeffer and Dobler, 2011). Als Folge der zunehmenden multifokalen ZNS-Schädigung treten vermehrt neurologische Symptome in den Vordergrund: Berichtet wird von Krämpfen, Paresen, generalisierter Ataxie, Myoklonus, propriotiver Dysfunktion, Vestibularsyndrom, Facialis-Parese, Anisokorie bis hin zum Verlust des Lidschlussreflexes (Tipold *et al.*, 1993; Klimeš *et al.*, 2001; Leschnik *et al.*, 2008; Pfeffer and Dobler, 2011). In 31 bis 59% der klinischen Fälle gehen die Symptome nach ein bis zwei Wochen vollständig zurück, allerdings sind auch Fälle mit deutlich verlängerter Remissionszeit beschrieben. Bei letzteren Fällen bleiben oft Langzeitfolgen wie Paresen, Muskelatrophie, epileptische Anfälle oder Blindheit zurück (Klimeš *et al.*, 2001; Leschnik *et al.*, 2002, 2008; Dobler *et al.*, 2018). Differentialdiagnostisch kommen Viruserkrankungen wie Staupe, Tollwut oder Morbus Aujeszky infrage, genauso aber auch diverse anderweitig bedingte Meningoenzephalitiden.

2.4. TBE bei Nutztieren

Rinder, Schafe und Ziegen sind empfänglich für TBEV-Infektionen, zeigen aber, selbst nach experimentellen Infektionen, keinerlei klinische Symptomatik (Gresíková, 1958; Nosek *et al.*, 1967; Dobler *et al.*, 2018). Allerdings tritt nach der Infektion regelmäßig eine Virämie auf, die bis zu 19 Tage andauert (Balogh *et al.*, 2012). In dieser Zeit wird infektiöses Virus auch über die Milch ausgeschieden und kann beim Verzehr von unpasteurisierter Milch oder deren Folgeprodukte (Käse etc.) zu alimentären TBEV-Infektionen führen (Holzmann *et al.*, 2009; Caini *et al.*, 2012; Dobler *et al.*, 2012; Dorko *et al.*, 2018). Eine Studie aus Polen untersuchte die Häufigkeit von TBEV in der Milch bei Weidevieh in einem Endemiegebiet. Dabei fand sich bei 22,2% der untersuchten Schafe, 14,8% der Ziegen und 11,1% der Kühe TBEV in der Milch (Cisak *et al.*, 2012). Wiederkäuer entwickeln spezifische Antikörper gegen TBEV, bei Ziegen und Schafen ergaben Untersuchungen eine Nachweisbarkeit der Antikörper von mindestens 28 Monaten (Klaus *et al.*, 2011, 2014; Dobler *et al.*, 2018). Hausschweine entwickeln ebenfalls Antikörper gegen TBEV und scheinen damit empfänglich für TBEV-Infektionen, auch hier nimmt die Erkrankung jedoch keinen symptomatischen Verlauf (Holzmann *et al.*, 2009).

2.5. TBE bei Wildtieren

Wildtiere spielen als Wirte eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Zeckenpopulationen. (Gómez Martínez, 2014; Dobler *et al.*, 2018). Untersuchungen bei Rehen in Deutschland ergaben eine Zeckenbelastung von durchschnittlich 65 Zecken pro Tier, Spitzenwerte lagen sogar bei bis zu 270 Zecken pro Reh (Vor *et al.*, 2010). Auf den Rehen fanden sich, von der Larve bis zur adulten Zecke, alle Entwicklungsstadien, wobei Zecken der Gattung *Ixodes*, Hauptvektoren des TBEV in Europa, auf einen Anteil von 92,6% kamen (Vor *et al.*, 2010). Verschiedenste Wildtiere wie Rehe, Rothirsche oder Wildschweine scheinen darüber hinaus auch empfänglich für TBEV-Infektionen zu sein, da sich bei ihnen entsprechende Antikörper gegen das TBEV nachweisen lassen. In endemischen Gebieten erreicht die Seroprävalenz zum Teil hohe Anteile. So zeigt eine Studie in Schweden beispielsweise Prävalenzraten von 62,5% bei Rehen, 43,5% bei Rothirschen, 34,1% bei Wildschweinen und 25,4% bei Damwild (Gómez Martínez, 2014). Wie bei den Hauswiederkäuern gibt es aber auch bei den Wildtieren bisher keine Veröffentlichungen die von einer symptomatischen Erkrankung berichten. Aufgrund der hohen Zecken-Infestationsraten eignen sich Wildtiere für die Überwachung und Detektion von TBEV-Herden. Vor allem in Gebieten mit hohen TBE-Impfraten, wie in Österreich (ca. 85%), spiegelt die Erfassung humaner Erkrankungsfälle die tatsächliche TBEV Verbreitung und das TBE-Risiko nur ungenügend wieder (Duscher *et al.*, 2015). Wie Studien zeigen, kann hier die serologische Untersuchung von Rehen helfen (Gerth *et al.*, 1995; Skarphéðinsson *et al.*, 2005; Kiffner *et al.*, 2012; Duscher *et al.*, 2015). Durch ihre streng territoriale Lebensweise, ihr Aktivitätsgebiet begrenzt sich auf eine Fläche von nur ca. 0,16 bis 0,81 km² (Radda *et al.*, 1968; Jeppesen, 1990), ist eine genaue Zuordnung der untersuchten Tiere zu einem bestimmten Gebiet möglich (Gerth *et al.*, 1995; Duscher *et al.*, 2015). Die Daten aus Prävalenzstudien bei Wildtieren sind häufig kongruent mit dem Auftreten humaner TBE-Erkrankungen (Gerth *et al.*, 1995). Allerdings konnten auch Gebiete mit hoher TBEV-Seroprävalenz im Wildtierbereich ausgemacht werden, in denen bisher nur wenige oder keine humanen Fälle aufgetreten sind. So konnte eine Studie aus Belgien bei 2,9% der untersuchten Wildschweine TBEV spezifische Antikörper

nachweisen, obwohl Belgien bislang als TBEV frei eingestuft wurde (Donoso-Mantke *et al.*, 2011; Kunze, 2016; Roelandt *et al.*, 2016). Auch Füchse wurden bereits positiv auf TBEV-spezifische Antikörper getestet (Rieger *et al.*, 1999). In verschiedenen Gebieten wurde die gemessenen Seroprävalenz der Füchse mit der Inzidenz humaner TBE-Fälle verglichen und ergab gute Korrelationen (Rieger *et al.*, 1999). Somit könnte auch die Untersuchung von Füchsen nützlich für das TBEV-Monitoring sein. Ob und in welcher Form Füchse an TBE erkranken und welche Rolle sie bei der Aufrechterhaltung und Verbreitung der TBEV spielen ist bislang noch unklar.

2.5.1. TBE bei Kleinsäugetieren

Kleinsäuger, vor allem Nager und Spitzmäuse, haben gleichermaßen bei der Erhaltung von TBEV-Herden und Erhaltung von Zeckenpopulationen einen entscheidenden Anteil. Sie stellen den wichtigsten Wirt für die Larven der *Ixodes* spp. dar und sind damit essentiell für den Bestand der Zeckenpopulation (Dobler *et al.*, 2018). Darüber hinaus sind Kleinsäuger auch bei der Infektion neuer Zecken mit TBEV von Bedeutung: Wie bereits oben beschrieben können Zecken das Virus zum einen über das Blut virämischer Wirte aufnehmen (Dobler *et al.*, 2012), zum anderen spielen Kleinsäuger auch bei der Übertragung durch Co-feeding eine wichtige Rolle (Labuda *et al.*, 1997; Lindquist and Vapalahti, 2008; Randolph, 2011). In einer Studie aus Finnland konnte mehrere Monate nach der Zeckensaison TBEV RNA im Gehirn und den inneren Organen von Nagern nachgewiesen werden (Tonteri *et al.*, 2011). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass TBEV möglicherweise Nager chronisch infiziert und dort über Wochen oder Monate persistieren kann.

2.5.2. TBE bei Vögeln

Vögel sind regelmäßig von Zecken (v.a. *Ixodes* spp.) befallen. Eine Studie aus Deutschland ermittelte beispielsweise eine durchschnittliche Infestation von zwei bis 4,7 Zecken pro Vogel, wobei auf einzelnen Vögeln bis zu 55 Zecken gefunden wurden (Klaus *et al.*, 2016). Die gesammelten Zecken wurden auch auf TBEV untersucht, jedoch ohne positives Ergebnis (Klaus *et al.*, 2016). In einer Studie aus Schweden wurden im Zuge der Beringung insgesamt 1.155 Zecken auf Zugvögeln gesammelt (auch hier v.a. *Ixodes* spp.) und auf TBEV untersucht, dabei ergab sich eine Infektionsrate von 0,52% (Waldenström *et al.*, 2007). Mit dem jährlichen Vogelzug könnte TBEV also auch über große Distanzen transportiert werden. In experimentellen Studien gelang nach Infektion bei einigen Vogelarten wie Hausspatzen (*Passer domesticus*), Wachteln (*Coturnix coturnix*) oder Enten (*Anas platyrhynchos*) sogar der Nachweis von Virus oder entsprechenden Antikörpern (Hubálek and Rudolf, 2012).

3. Diagnostik

3.1. Differentialdiagnostik

TBE-Patienten können, wie oben beschrieben, mit verschiedensten Symptomen, von Fieber und Kopfschmerzen bis hin zu neurologischer Symptomatik einer Meningitis, Meningoenzephalitis oder Meningoenzephalomyelitis/Radikulitis, vorstellig werden (Dumpis *et al.*, 1999; Holzmann, 2003). Alle diese Symptome sind nicht spezifisch für die TBE, sodass eine Reihe weiterer neurologischer Erkrankungen differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden müssen (Dumpis *et al.*, 1999; Holzmann, 2003; Studahl *et al.*, 2013; Valarcher *et al.*, 2015). Auch weitere zeckenübertragene Erkrankungen wie Tularämie (*Francisella tularensis*), Fleckfieber (*Rickettsia rickettsii*), Babesiose (*Babesia* spp.), Borreliose (*Borrelia burgdorferi* s.l.) oder Ehrlichiose (*Ehrlichia* spp.) können ähnliche Symptome (Fieber, Kopfschmerzen, neurologische Symptome) verursachen (Logigian *et al.*, 1990; Spach *et al.*, 1993; Ratnasamy *et al.*, 1996; Dumpis *et al.*, 1999). Bei einigen Erregern wie Borrelien und Ehrlichien überschneiden sich zudem die Endemiegebiete mit dem des TBEV (Dumler *et al.*, 1997; Fingerle *et al.*, 1997; Dumpis *et al.*, 1999). Auch

Doppelinfectionen mit TBEV und Borrelien, Ehrlichien oder Rickettsien sind in der Literatur beschrieben (Kristoferitsch *et al.*, 1986; Oksi *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1996; Nadelman *et al.*, 1997; Sexton *et al.*, 1998). Betroffene Patienten bedürfen schnellstmöglich einer antibiotischen Therapie, sodass eine schnelle Differenzierung von reinen TBE-Patienten für den Heilungserfolg von großer Bedeutung ist (Dumpis *et al.*, 1999). Auch verschiedene andere Virusinfektionen können aseptische Meningitiden verursachen und müssen entsprechend differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden (Johnson, 1996; Dumpis *et al.*, 1999). Stellvertretend soll hier die Herpes simplex-Infektion genannt werden, für die potente antivirale Therapeutika verfügbar sind: So senkt eine rechtzeitige Therapie mit Acyclovir die Mortalitätsrate von über 70% auf 19% (Johnson, 1996; Dumpis *et al.*, 1999). Dieses Beispiel unterstreicht wiederum die Wichtigkeit einer schnellen und sicheren Diagnostik.

3.2. Weiterführende Diagnostik

Bei TBE-Patienten zeigt sich im Zuge einer Lumbalpunktion häufig ein erhöhter intrakranieller Druck (Dumpis *et al.*, 1999). Die Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) ergibt einen in der Regel normalen Glucosespiegel, leicht erhöhte Proteinwerte und eine leichte Pleozytose (100-300 Zellen/ μ l) (Dumpis *et al.*, 1999; Holzmann, 2003). Unter den zellulären Bestandteilen haben segmentkernige Granulozyten mit 60 bis 70% den größten Anteil, gefolgt von Lymphozyten mit 30 bis 40% (Holzmann, 2003). Weitere Befunde können ein erhöhtes CSF/Serumalbumin-Verhältnis als Ausdruck einer leichten Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, sowie die intrathekale Produktion von IgM-Immunglobulinen sein (Kaiser, 1999; Kaiser and Holzmann, 2000; Holzmann, 2003). Diese Befunde verstärken den TBE-Verdacht, sind aber nicht beweisend (Holzmann, 2003). Mit der Magnetresonanztomographie (MRT) kann in der T2-Wichtung, bei ca. 20% der Patienten, eine Signal-Hyperintensität vereinbar mit pathologischen Veränderungen im Bereich des Thalamus, in einigen Fällen darüber hinaus auch in anderen Bereichen des Gehirns oder Rückenmarks, dargestellt werden (Kaiser, 1999, 2016; Marjelund *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2005). Lokalisation und Grad der Veränderungen können dabei helfen den weiteren Krankheitsverlauf zu

prognostizieren (Marjelund *et al.*, 2004). Bei entsprechenden MRT-Befunden sollte eine TBE in Betracht gezogen werden, jedoch sind auch diese Befunde nicht TBE-spezifisch und erlauben keine definitive Diagnose (Marjelund *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2005; Kaiser, 2016). Andere bildgebende Verfahren wie die Emissionscomputertomographie (single photon emission computed tomography, SPECT) zur Bestimmung des cerebralen Blutflusses haben nur wenig Aussagekraft (Günther *et al.*, 1998; Kaiser, 1999; Holzmann, 2003).

3.3. Spezifische Labordiagnostik

3.3.1. Direkter Virusnachweis

Um einen klinischen Verdacht auf TBE zu bestätigen ist eine labordiagnostische Untersuchung unerlässlich. In der ersten Krankheitsphase bestehen verschiedene Möglichkeiten eines direkten Erregernachweises (Holzmann, 2003): So kann Virus direkt aus dem Patientenblut in (Säuger-)Zellkultur isoliert werden (Donoso-Mantke *et al.*, 2011; Valarcher *et al.*, 2015). Der Nachweis virusspezifischer Nukleinsäure im Serum des Patienten ist mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (reverse-transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) möglich (Holzmann, 2003; Schwaiger and Cassinotti, 2003; Schultze *et al.*, 2007; Achazi, Nitsche, *et al.*, 2011). Außerdem kann Virus post mortem elektronenmikroskopisch im ZNS identifiziert oder wiederum mittels RT-PCR in Gehirn- oder sonstigem Organmaterial nachgewiesen werden (Mázló and Szántó, 1978; Holzmann, 2003). Der direkte Virusnachweis, beispielsweise mittels PCR, kann für die TBE-Abklärung in einem frühen Krankheitsstadium von großem Nutzen sein, vor allem in Gebieten in denen mehrere zeckenübertragenen Krankheiten endemisch sind (Saksida *et al.*, 2005; Schultze *et al.*, 2007; Donoso-Mantke *et al.*, 2011). Die Wahl des richtigen Zeitpunktes bei der Probennahme ist dabei entscheidend für den erfolgreichen Virusnachweis: Am besten gelingt der RNA-Nachweis in der ersten Woche der Erkrankung während der transienten Virämie; bereits in der zweiten Woche, mit beginnender Antikörperbildung, geht die Wahrscheinlichkeit eines positiven PCR-

Nachweises jedoch schon deutlich zurück (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1995; Holzmann, 2003; Donoso Mantke *et al.*, 2011).

Bei immunsupprimierten Patienten kann die Antikörperbildung jedoch stark verzögert sein oder gänzlich ausbleiben, was eine deutlich verlängerte Virämie zur Folge haben kann (Caracciolo *et al.*, 2015; Dobler *et al.*, 2018). Ein Fallbericht aus Italien beschreibt ein entsprechendes Beispiel: Ein durch Chemotherapeutika immunsupprimierter Patient zeigte hier eine persistierende Virämie über 56 Tage (Caracciolo *et al.*, 2015).

Die RT-PCR stellt damit auch bei atypischen Krankheitsverläufen, wie Patienten mit verzögerter Antikörperbildung oder bei sehr schweren Verläufen mit frühzeitigem Tod des Patienten ein wertvolles diagnostisches Werkzeug dar (Schwaiger and Cassinotti, 2003; Gelpi *et al.*, 2005; Donoso Mantke *et al.*, 2011).

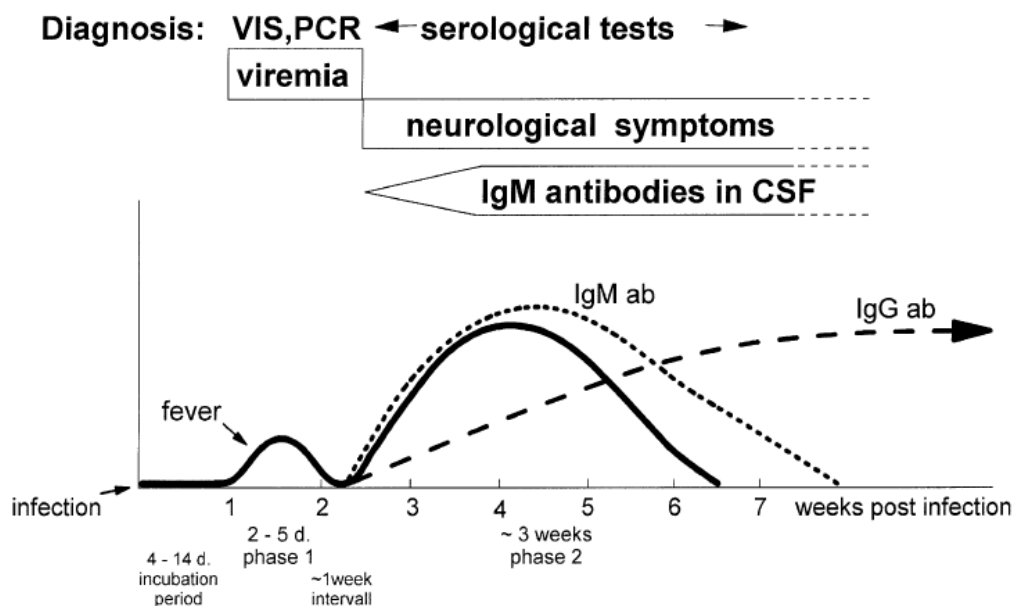


Abbildung 8

Biphasischer Verlauf einer TBEV-Infektion: Virusisolation (VIS) oder Nachweis viraler Nukleinsäure durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie Bildung spezifischer Antikörper (ab) in Serum und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) (Holzmann, 2003).

3.3.2. Indirekter Virusnachweis

Die große Mehrheit der TBE-Patienten wird für gewöhnlich erst nach

Einsetzen von neurologischen Symptomen bei einem Arzt vorstellig (Donoso Mantke *et al.*, 2011). Spätestens mit dem Beginn der zweiten Phase und dem Einsetzen von neurologischen Symptomen ist die Virämie jedoch beendet und die humorale Immunantwort hat eingesetzt (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1995; Holzmann, 2003; Donoso-Mantke *et al.*, 2011). Versuche, Virus zu diesem Zeitpunkt noch direkt nachzuweisen, sind (wie oben beschrieben) in der Regel nicht mehr erfolgreich (Puchhammer-Stöckl *et al.*, 1995; Günther *et al.*, 1997). Daher beruht die TBE-Diagnostik in der Praxis vor allem auf dem serologischen Nachweis TBEV-spezifischer Antikörper (Holzmann, 2003; Donoso-Mantke *et al.*, 2011). Als beweisend für eine TBE gilt der Nachweis von gleichzeitig signifikant erhöhten Titern der TBEV-spezifischen Antikörpern vom Typ Immunglobulin-M (IgM) und Immunglobulin-G (IgG), oder ein signifikanter Anstieg der IgG-Antikörper (Holzmann, 2003; Valarcher *et al.*, 2015; Kaiser, 2016).

3.3.2.1. Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (complement fixation assay, CFA) ist eine der ältesten Methoden zum Nachweis spezifischer Antikörper, kann aber nicht zwischen Isotypen unterscheiden, da sowohl IgM- als auch IgG-Antikörper an Komplementfaktoren binden (Kunz and Krausler, 1964; Dobler *et al.*, 2018). Für die TBE Diagnose ist ein signifikanter Anstieg der Antikörpertiter mindestens um das Vierfache in Serumpaaren gefordert, die den Patienten im Abstand von zehn bis 14 Tagen abgenommen werden (Holzmann, 2003; Dobler *et al.*, 2018). Vor allem in der zweiten Krankheitsphase, zehn bis 14 Tage nach der TBEV-Infektion, ist bei Patienten ein deutlicher Anstieg der komplementbindenden Antikörpern zu sehen, wobei der Höhepunkt nach ca. fünf bis zehn Wochen erreicht wird und danach langsam abfällt (Slonim and Hloucal, 1959; Dobler *et al.*, 2018). Die Komplementbindungsreaktion ist sehr zeitaufwändig und wird daher heute nicht mehr zur TBE-Diagnostik eingesetzt.

3.3.2.2. Hämagglutinationshemmtest

Das E-Protein von TBEV und anderen Flaviviren besitzt die Eigenschaft die Erythrozyten männlicher Gänse zu agglutinieren (Clarke and Casals, 1958; Dobler *et al.*, 2018). Bei Anwesenheit von Antikörpern gegen das E-Protein

geht diese Eigenschaft verloren, ein Effekt, den der Hämagglutinationshemmtest (hemagglutination inhibition test, HI) für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen das E-Protein von TBEV nutzt. Für die TBE-Diagnose ist wiederum der Nachweis eines vierfachen Titeranstieges zwischen zwei Verlaufsseren erforderlich. Auch der HI kann nicht zwischen Antikörper-Isotypen unterscheiden, IgM und IgG Antikörper werden gleichermaßen nachgewiesen (Dobler *et al.*, 2018). Erst durch einen weiteren Schritt ist eine genauere Eingrenzung möglich: Die Vorbehandlung der Serumprobe mit 2-Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken, die die IgM-Pentamere zusammenhalten, sodass inaktive IgM-Monomere zurückbleiben (Kunz *et al.*, 1971; Dobler *et al.*, 2018). Durch diese Vorbehandlung fällt der HI-Titer bei Anwesenheit von IgM im Vergleich zu einer unbehandelten Vergleichsprobe deutlich ab, ein Indiz für eine akute TBE (Kunz *et al.*, 1971; Holzmann, 2003). Obwohl der HI sehr anfällig für Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Flaviviren oder Impfantikörper ist, findet er in einigen Ländern nach wie vor Verwendung (Dobler *et al.*, 2018).

3.3.2.3. Neutralisationstest

Mit Hilfe des Neutralisationstestes (NT) wird die Menge an infektiösem Virus bestimmt, die durch die im Körper gebildeten Antikörper neutralisiert werden kann (Heinz *et al.*, 1969; Dobler *et al.*, 2018). Zu einer definierten Virusmenge werden dabei unterschiedliche Serumverdünnungen zugegeben und die Titerstufe ermittelt, bei der die vorher definierte Anzahl infektiöser Viruspartikel in der Zellkultur signifikant (50% oder 90%) reduziert wird. Dies kann durch die Reduzierung von mit dem Auge ablesbaren Virusplaques (Plaquereduktions-Neutralisationstest, PRNT) oder die Reduktion von zytopathischem Effekt in der Zellkultur (NT ID₅₀) durchgeführt werden (Dobler *et al.*, 2018). Daneben existieren noch weitere Varianten des NT, unter anderem mit umgekehrtem Ansatz, also einer definierten Serumverdünnung und unterschiedlichen Viruskonzentrationen (Heinz *et al.*, 1969; Dobler *et al.*, 2018). Neutralisierende Antikörper werden ca. zwei Wochen nach Infektion des Patienten gebildet (Dobler *et al.*, 2018). Der NT stellt die einzige Möglichkeit dar, eine Immunität des Patienten, beispielweise nach der Impfung, zu belegen (Dobler *et al.*, 2018).

Außerdem gelten die neutralisierenden Antikörper als besonders spezifisch, sodass im NT nur geringe Kreuzreaktionen mit TBEV-Antikörpern gegen andere Flaviviren auftreten (Dobler *et al.*, 2018).

3.3.2.4. Immunfluoreszenztest

In der TBE-Diagnostik kommen in der Regel indirekte Immunfluoreszenztestsyste (indirekt immunofluorescence assay, IIFA) zum Einsatz, bei denen TBEV-infizierte, permeabilisierte Zellen auf einem Objektträger fixiert werden (Sonnenberg *et al.*, 2004). Nach Auftragen von Patientenserum in unterschiedlichen Verdünnungsstufen werden virusgebundene Antikörper durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers in Form eines charakteristischen Färbemusters sichtbar gemacht (Dobler *et al.*, 2018). Der IIFA ermöglicht, durch die Wahl des passenden Sekundärantikörpers, eine klare Differenzierung von IgM- und IgG-Antikörpern. Durch die hohe Standardisierbarkeit und ein hohes Maß an Sensitivität und eine gegenüber dem ELISA höhere Spezifität, gilt der IIFA (neben ELISA-Testsystemen, s.u.) als Standardmethode in der TBE-Diagnostik (Sonnenberg *et al.*, 2004; Litzba *et al.*, 2014).

3.3.2.5. ELISA

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) ist heute das am häufigsten eingesetzte Format für die TBE-Diagnostik (Roggendorf *et al.*, 1981; Holzmann, 2003; Lindquist and Vapalahti, 2008). Auf dem Markt sind zahlreiche Varianten erhältlich, durch die Verwendung entsprechender Antigene sogar auf die einzelnen TBEV-Subtypen zugeschnitten (Dobler *et al.*, 2018). Als Antigen kommen Ganzzell-Lysate infizierter Zellen oder daraus gewonnene, aufgereinigte Extrakte zum Einsatz (Litzba *et al.*, 2014; Dobler *et al.*, 2018). Durch Verwendung der passenden Sekundärantikörper ist zudem eine differenzierte Untersuchung auf unterschiedliche Antikörper-Isotypen möglich, wobei für die Diagnostik nur IgM- und IgG-Antikörper von Relevanz sind (Holzmann, 2003; Kaiser, 2016; Dobler *et al.*, 2018). ELISA-Formate sind generell sehr sensitiv (bis zu 99%), genauso aber auch anfällig für falsch positive Ergebnisse; vor allem bei IgG-Antikörpern treten zum Teil starke Kreuzreaktionen infolge anderer Flavivirusinfektionen oder -impfungen auf (Holzmann *et al.*, 1996; Litzba *et al.*, 2014; Dobler *et al.*,

2018). Spezifischer ist die Diagnostik basierend auf IgM-Antikörpern, die generell weniger Kreuzreaktionen gegen andere Flaviviren zeigen (Hofmann *et al.*, 1991; Dumpis *et al.*, 1999; Niedrig *et al.*, 2007). Kann eine andere Flavivirusinfektion oder –impfung anamnestisch ausgeschlossen werden, sind Spezifitäten bis 97% möglich (Dobler *et al.*, 2018). IgM- und IgG-Antikörper können bei TBE-Patienten mit klinisch manifester Erkrankung regelmäßig bereits in der ersten Serumprobe nachgewiesen werden (Holzmann, 2003; Dobler *et al.*, 2018). Zusammen mit der schnellen und einfachen Durchführbarkeit sowie der guten Sensitivität und Spezifität stellen ELISA-Testsysteme die am weitesten verbreitete Methode in der Routinediagnostik dar (Hofmann *et al.*, 1983:19).

3.3.3. Diagnostische Limitationen

3.3.3.1. Persistierende IgM-Antikörper

Sowohl nach den ersten beiden TBE-Impfungen, als auch nach echten TBEV-Infektionen können IgM Antikörper über einen Zeitraum von bis zu neun Monaten persistieren (Roggendorf *et al.*, 1981; Hofmann *et al.*, 1983; Holzmann, 2003). Tritt in dieser Zeit eine andere ZNS-Erkrankung auf, kann der bestehende, TBEV-spezifische, IgM-Titer zu einer falsch positiven TBE-Diagnose führen, die eigentliche Erkrankung bleibt unerkannt (Holzmann, 2003; WHO, 2011a). Bei Verdacht auf persistierende IgM-Antikörper können weiterführende Testverfahren Aufschluss geben. So weist der Nachweis von lokal im ZNS produzierten IgM-Antikörpern auf eine akute oder kurz zurückliegende TBEV-Infektion hin (Holzmann, 2003; Lindquist and Vapalahti, 2008). Um zu unterscheiden, ob Antikörper intrathekal produziert worden sind oder passiv durch eine geschädigte Blut-Hirn-Schranke in die CSF diffundiert sind, wird das Verhältnis (Antikörpertiter CSF)/(Antikörpertiter Serum) berechnet. Sind in der CSF signifikant höhere Titer nachweisbar, kann von einer lokalen, intrathekalen Produktion ausgegangen werden (Günther *et al.*, 1997). Eine Studie aus Schweden konnte jedoch bei einem Fünftel der untersuchten Patienten auch 11 bis 13 Monate nach Infektion noch TBEV-spezifische IgM-Antikörper in der CSF nachweisen (Günther *et al.*, 1997). Weiterhin kann eine Aviditätsmessung der IgG-Antikörper im Serum oder eine Verlaufskontrolle hilfreich für den

Nachweis einer akuten TBEV-Infektion und für die Unterscheidung von persistierenden Antikörpertitern sein (Gassmann and Bauer, 1997; Holzmann, 2003).

3.3.3.2. Kreuzreaktionen

Flavivirus-Infektionen (z.B. Dengue-Fieber) oder Flavivirus-Impfungen mit Lebendvakzinen (z.B. YFV) können zum Teil stark mit TBEV kreuzreagierende Antikörper induzieren (Holzmann *et al.*, 1996; Holzmann, 2003; Valarcher *et al.*, 2015). Diese Kreuzreaktionen haben entsprechend großen Einfluss auf die Aussagekraft von ELISA-Testsystemen oder IIFA, bieten gleichzeitig aber keinerlei Schutzwirkung im Sinne neutralisierender Antikörper (Holzmann, 2003). Vor allem in Gebieten, in denen mehr als eine Flavivirus-Infektion endemisch ist, aber auch durch den zunehmenden Fernreiseverkehr, stellt die Problematik durch kreuzreaktive Antikörper eine große Herausforderung für die TBE-Diagnostik dar (Holzmann, 2003). In zweifelhaften Fällen sollte ein NT durchgeführt werden, der von allen Diagnostikmethoden die höchste Spezifität aufweist (Holzmann, 2003; Dobler *et al.*, 2018). Wie oben beschrieben, ist dazu aber eine Zellkultur und lebendes Virus erforderlich, zudem ist die Durchführung nur in einem BSL 3-Labor möglich und damit technisch anspruchsvoll, aufwendig und teuer (Holzmann, 2003; Dobler *et al.*, 2018). Somit bleibt die NT-Diagnostik entsprechend ausgestatteten Speziallaboren vorbehalten. Alternativ kann ein Titeranstieg um das Vierfache in einer Verlaufsprobe, die mit 14-tägigem Abstand entnommen wird, die TBE-Diagnose sichern (WHO, 2011a).

4. Therapie und Prävention

4.1. Therapie

Eine kausale Therapiemöglichkeit für die TBE ist bislang nicht verfügbar (Kaiser, 2008, 2016; Lindquist and Vapalahti, 2008; Valarcher *et al.*, 2015). Zum Zeitpunkt neurologischer Symptomatik scheint eine antivirale Therapie nicht zielführend, da das Virus bereits nicht mehr nachgewiesen werden kann (Studahl *et al.*, 2013; Valarcher *et al.*, 2015). Studien, bei denen nach TBEV-Exposition Therapieversuche mit spezifischen Immunglobulinen unternommen wurden, zeigten eine Verschlechterung der Symptomatik nach Verabreichung, sodass die Therapie abgebrochen wurde (Waldvogel

et al., 1996; Bröker and Kollaritsch, 2008; Valarcher *et al.*, 2015). Bei klinischer Manifestation der TBE erfolgt daher eine hauptsächlich symptomatische Therapie unter Einsatz nichtsteroidaler Antiphlogistika (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) (Dumpis *et al.*, 1999; Studahl *et al.*, 2013; Valarcher *et al.*, 2015). In schweren Fällen werden gelegentlich Glucocorticoide eingesetzt, was zu einer schnellen Besserung der Symptomatik führen soll. Klinische Studien, die entsprechende Therapierfolge belegen, liegen derzeit aber nicht vor (Dumpis *et al.*, 1999; Mickienė *et al.*, 2002; Lindquist and Vapalahti, 2008). In jedem Fall müssen Patienten, die Symptome einer Meningoenzephalitis zeigen, engmaschig überwacht werden, da sich in Folge des Hirnödems innerhalb kürzester Zeit Koma oder Atemlähmung entwickeln können (Dumpis *et al.*, 1999). So waren in einer Studie aus Deutschland bei 12% der Patienten intensivmedizinische Maßnahmen und in 5% der Patienten künstliche Beatmung erforderlich (Kaiser, 1999; Lindquist and Vapalahti, 2008).

4.2. Expositionsprophylaxe

Einer TBEV-Infektion kann vorgebeugt werden, indem die potentiellen Überträger, Zecken und unbehandelte Milchprodukte, so weit als möglich gemieden werden (Dumpis *et al.*, 1999). Durch die sehr kurze Latenz zwischen Zeckenstich und Infektion (siehe Übertragung) bietet auch frühzeitiges Entfernen der Zecken keinen sicheren Schutz (Kaiser, 2016). Auch die Anwendung von Repellentien, das Meiden möglicher Risikogebiete oder das Tragen von Schutzkleidung stellt keinen sicheren Schutz vor einer TBEV-Infektion dar (Kunze *et al.*, 2004; Demicheli *et al.*, 2009). In der ehemaligen UdSSR wurde versucht, das TBEV-Infektionsrisiko über eine Reduktion der Zeckenpopulation mit Hilfe von Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) zu senken (Valarcher *et al.*, 2015). Diese Versuche gefährdeten nicht nur die Öffentliche Gesundheit und die Umwelt, sondern blieben überdies auch erfolglos (Piesman and Beard, n.d.; Valarcher *et al.*, 2015).

4.3. Impfprophylaxe

Die TBE-Impfung stellt die wichtigste und wirkungsvollste Maßnahme zur Prävention einer TBE-Erkrankung dar (Demicheli *et al.*, 2009; WHO, 2011b;

Kollaritsch *et al.*, 2012; Valarcher *et al.*, 2015). Bereits 1937 wurde der erste TBE-Impfstoff in der ehemaligen UdSSR entwickelt, da TBE-Ausbrüche (damals noch RSSE) ein zunehmendes Problem der öffentlichen Gesundheit darstellten (Barrett *et al.*, 1999; Demicheli *et al.*, 2009; WHO, 2011b). Diese ersten aus Mäusehirn gewonnen Impfstoffe waren wirksam, hatten aber oftmals schwere unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge (Demicheli *et al.*, 2009; WHO, 2011b). Moderne Impfstoffe sind deutlich weniger reaktogen und basieren auf Formalin-inaktiviertem Virus, das in Zellkulturen hergestellt wird (WHO, 2011b). Den globalen TBE-Impfstoffmarkt teilen sich derzeit fünf Präparate (WHO, 2011b; Dobler *et al.*, 2018). FSME-Immun (Pfizer, Österreich), basierend auf dem österreichischen Virusstamm Neudörfl (TBEV-Eu) und Encepur (GSK, Deutschland), mit dem in Süddeutschland isolierten Stamm K23, werden in Europa hergestellt und sind in verschiedenen Ländern Europas zugelassen und verfügbar (WHO, 2011a; Dobler *et al.*, 2018). Die in Russland hergestellten Impfstoffe Moscow (TBE-Moscow) und EnceVir (Microgen) basieren auf TBEV-FE Stämmen und sind nicht auf dem europäischen Markt zugelassen (WHO, 2011b; Dobler *et al.*, 2018). Außerdem gibt es noch den chinesischen Impfstoff Sen Tai Bao (Chanchun Institute of Biological Products), der auf dem Virusstamm Senzhang (TBEV-FE) basiert und vor allem an der Nordgrenze Chinas eingesetzt wird (Lu *et al.*, 2008; WHO, 2011b; Morozova *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2017; Dobler *et al.*, 2018). Die Grundimmunisierung umfasst bei allen Impfstoffen drei bis vier Einzelimpfungen, mit Ausnahme des chinesischen Präparates, hier sind nur zwei Impfungen vorgesehen (Kollaritsch *et al.*, 2012; Valarcher *et al.*, 2015; Kaiser, 2016; Dobler *et al.*, 2018). Je nach Impfpräparat und Alter des Patienten sind im Anschluss alle drei bis fünf Jahre entsprechende Auffrischungsimpfungen erforderlich, um den Impfschutz aufrecht zu erhalten (Kollaritsch *et al.*, 2012; Valarcher *et al.*, 2015; Dobler *et al.*, 2018). Für keinen der auf dem Markt verfügbaren Impfstoffe gibt es Studien bezüglich ihrer Wirksamkeit (WHO, 2011b; Dobler *et al.*, 2018). Für die Zulassung wurden Studien zur Immunogenität und Sicherheit durchgeführt, die durchwegs starke Immunantworten mit Serokonversionsraten von über 87% attestierten (Demicheli *et al.*, 2009; Dobler *et al.*, 2018). Bei den heutigen europäischen Impfstoffen treten, abgesehen von lokalen

Reaktionen an der Impfstelle, sowie gelegentlich Fieber, keine Nebenwirkungen mehr auf (Kollaritsch *et al.*, 2012; Valarcher *et al.*, 2015). Stärkere Nebenwirkungen werden bei den russischen Impfstoffen beschrieben, hier können Fieber und gelegentlich auch Krämpfe, Übelkeit und Kopfschmerzen auftreten (Marth and Kleinhapfl, 2001; Valarcher *et al.*, 2015). Obwohl die Impfstämme bereits vor etlichen Jahren isoliert worden sind, induzieren die Impfpräparate, die auf TBEV-EU- oder TBEV-FE-Stämmen basieren, dank der geringen genetischen Variation unter den TBEV noch immer gute, heterologe Schutzwirkung (Holzmann *et al.*, 1992; Fritz *et al.*, 2012; Valarcher *et al.*, 2015). Kreuzimmunität bei TBEV-EU- oder TBEV-FE-Impfstoffen mit TBEV-Sib-Stämmen scheint ebenfalls zu bestehen, hier können aber starke Abweichungen bezüglich des Impfschutzes auftreten (Orlinger *et al.*, 2011; Valarcher *et al.*, 2015). Wie effektiv die TBE-Prävention durch Impfung ist, zeigt das Beispiel Österreichs. So hatte Österreich bis zur Einführung der Impfkampagne 1981 die höchste TBE-Inzidenz Europas (Valarcher *et al.*, 2015). Nach der Einführung der großflächigen Impfungen hat sich die Zahl der TBE-Fälle auf derzeit 65 bis 75 Fälle pro Jahr reduziert – das entspricht nur noch etwa 10% der früheren Fallzahlen (Kunz, 2003; Heinz *et al.*, 2007; WHO, 2011a). Für die Veterinärmedizin sind derzeit keine zugelassenen Impfstoffe verfügbar (Valarcher *et al.*, 2015).

4.4. Impfversagen

Auch nach vollständiger Grundimmunisierung und Einhalten der vorgeschriebenen Auffrischungsintervalle kommt es gelegentlich zu TBE-Erkrankungen bei geimpften Patienten (Stiasny *et al.*, 2009; Andersson *et al.*, 2010; WHO, 2011a). Für dieses Phänomen gibt es verschiedene Bezeichnungen mit entsprechenden Definitionen, die sich zum Teil überschneiden (siehe unten). Ursächlich für eine Erkrankung trotz Impfung können verschiedenste Gründe sein, von einer Immunsuppression des Impflings mit entsprechend ausbleibender oder zu schwacher Antikörperbildung, bis hin zu einem falsch durchgeführten Impfbereitstellung (Heininger *et al.*, 2012).

4.4.1. Klinisches Impfversagen

Klinisches Impfversagen beschreibt das Auftreten einer klinischen Erkrankung bei einem Patienten, der adäquat und vollständig gegen die entsprechende Erkrankung geimpft worden ist, unter Berücksichtigung der entsprechenden Zeit nach Impfung, die zum Aufbau einer schützenden Immunität erforderlich ist (Heininger *et al.*, 2012).

4.4.2. Serologisches Impfversagen

Bei serologischem Impfversagen ist, im Unterschied zu klinischem Impfversagen, keine klinische Manifestation der Erkrankung, gegen die der Impfschutz gerichtet ist, erforderlich (Heininger *et al.*, 2012). Serologisches Impfversagen bezeichnet die Unfähigkeit eines adäquat und vollständig gegen die entsprechende Erkrankung geimpften Patienten, eine schützende Immunität aufzubauen; auch hier ist die Zeit, die normalerweise für den Aufbau einer Immunität nach Grundimmunisierung nötig ist, zu berücksichtigen (Heininger *et al.*, 2012).

4.4.3. Impfdurchbruch

Ein Impfdurchbruch (vaccination breakthrough, VBT) ist definiert als:

(a) Bestätigter TBE-Fall (TBE-Falldefinition siehe (Lenhard *et al.*, 2016) nach korrekt abgeschlossener Grundimmunisierung oder

(b) eine vollständige Grundimmunisierung mit rechtzeitiger Auffrischungsimpfung und Infektion innerhalb von drei Jahren nach der letzten Impfung (Grgič-Vitek *et al.*, 2010; Lenhard *et al.*, 2018). Damit entspricht diese Definition im Wesentlichen dem klinischen Impfversagen nach Heininger (Heininger *et al.*, 2012). Studien aus Österreich und Schweden zeigten bei Impfdurchbrüchen eine charakteristische Dynamik der Antikörperbildung: Die IgM-Antwort erfolgte verzögert und erreichte nur niedrige Titer, während bei der IgG-Antwort schnell hohe Titer erreicht wurden (Stiasny *et al.*, 2009; Andersson *et al.*, 2010; WHO, 2011a). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Immunantwort bei VBTs nicht ausreichend oder nicht schnell genug erfolgt, um eine klinische Erkrankung zu unterbinden (WHO, 2011a). Über 70% der Patienten mit VBTs waren außerdem älter als 50 Jahre (Stiasny *et al.*, 2009; Andersson *et al.*, 2010; WHO, 2011a). Bei älteren Patienten könnten somit kürzere

Auffrischungsintervalle und eine serologische Kontrolle des vorhandenen Impfschutzes hilfreich sein, um TBE-Erkrankungen trotz Impfung zu verhindern (Hainz *et al.*, 2005; Paulke-Korinek *et al.*, 2009; WHO, 2011a). VBTs können sich auch für die TBE-Diagnostik problematisch darstellen: Durch den verzögerten Anstieg der IgM-Titer sind zum Zeitpunkt des Auftretens klinischer Symptome unter Umständen nur IgG-Antikörper nachweisbar, was als zurückliegende TBE-Infektion oder Zustand nach TBEV-Impfung interpretiert werden kann (Stiasny *et al.*, 2009). Um eine akute TBE auch bei VBT zu erkennen, ist bei hohen IgG-Titern unbedingt die Untersuchung einer Verlaufssprobe im Abstand von ca. zehn Tagen erforderlich (Holzmann, 2003; Stiasny *et al.*, 2009). Alternativ kann der Nachweis von intrathekalen Antikörperbildung oder eine Aviditätsmessung der TBEV-spezifischen IgG-Antikörper hilfreich sein (Gassmann and Bauer, 1997; Günther *et al.*, 1997; Holzmann, 2003).

III.ZIELE

Entwicklung eines NS1 basierten ELISA-Testsystems zur Detektion von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern gegen das TBEV.

Die Verfügbarkeit zuverlässiger und effizienter Testsysteme für die sichere Diagnostik der TBE ist essentiell, um die öffentliche Gesundheit wirksam durch entsprechende Maßnahmen schützen zu können. Vor dem Hintergrund der sich ausdehnenden Risikogebiete, gilt dies heute mehr denn je. Neben der bislang fehlenden Unterscheidbarkeit von Impf- und Infektionsantikörpern stellt der zunehmende Reiseverkehr die TBE-Diagnostik vor Herausforderungen, da hierdurch heute auch Infektionen (oder entsprechende Schutzimpfungen) mit in den TBEV-Endemiegebieten nicht vorkommenden Flavivirusinfektionen möglich sind, die in der TBE-Diagnostik potentiell kreuzreagieren können. Um diese diagnostischen Herausforderungen besser bewältigen zu können, sollte ein neues, NS1 basiertes ELISA-Testverfahren etabliert und gemäß den Anforderungen der DIN ISO EN 15189 für den Einsatz in der Routinediagnostik validiert werden.

IV. PUBLIKATION

Das Literaturverzeichnis der Publikation wird im Zitierstil des Journals ausgegeben. Die Nummerierung von Abbildungen und Tabellen bezieht sich auf die publizierte Form des Manuskripts. Die in dem Manuskript enthaltene Literatur ist nicht im Literaturverzeichnis am Ende der Dissertationsschrift enthalten.

Das Manuskript wird in zur Veröffentlichung angenommener Form vorgelegt.

Tick-Borne Encephalitis Virus Nonstructural Protein 1 IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Differentiating Infection versus Vaccination Antibody Responses

P. Gierl^a, M. Bestehorn-Willmann^d, S. Zange^a, J. Borde^{b,c}, G. Dobler^a and H. von Buttlar^a

^a Bundeswehr Institute of Microbiology, German National Consultant Laboratory for TBEV, Munich, Germany

^b Division of Infectious Diseases, Department of Medicine II, University of Freiburg Medical Center and Faculty of Medicine, Freiburg, Germany

^c Praxis Dr. J. Borde/Gesundheitszentrum Oberkirch, Oberkirch, Germany

^d Institute of Zoology, Parasitology, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

Journal of Clinical Microbiology April 2020

DOI: 10.1128/JCM.01783-19

ABSTRACT

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is an important central nervous system (CNS) infection in Europe and Asia. It is a flavivirus in the tick-borne group. Effective vaccines against TBE are available in the affected countries. However, diagnosing TBE is challenging due to cross-reactive antibodies between different viruses of the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. Differentiation between infection-induced and vaccine-induced antibodies can be difficult and in many cases impossible, due to the increasing vaccination rate against TBEV. We present a new approach to detect antibodies against the TBEV non-structural protein 1 (NS1) as a diagnostic marker, which is exclusively indicative for virus replication in natural infection on the basis of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A total of 188 anonymous serum samples from the National Consultant Laboratory for TBEV were included in our study. The assay was validated according to the European Laboratory Norm DIN EN ISO 15189 for diagnostic use. The ELISA for the detection of TBEV NS1 specific IgG class antibodies reached a sensitivity of >94% and a specificity of >93% in broadly cross-reacting sera from patients with vaccinations against flaviviral diseases and single or multiple flavivirus infections, respectively. The detection of anti-NS1 antibodies is feasible and facilitates reliable differentiation between different flavivirus infections, TBEV infection and TBE vaccination.

Introduction

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is the most important tick-borne viral pathogen in Europe, causing severe neurological infections in humans, with approximately 10,000 – 12,000 cases per year. (1, 2) TBEV is endemic in large parts of Europe and Asia, where it comprises three accepted genetic subtypes: Western (TBEV-EU), Far Eastern (TBEV-FE) and Siberian (TBEV-Sib). At least two additional subtypes (Baikalian and Himalayan) have been proposed.

The virus is transmitted to humans primarily by ticks (*Ixodes persulcatus* in Asia and northeastern Europe, *Ixodes ricinus* in Central, Northern, Eastern Europe) (3). Alimentary transmission by consuming unpasteurized dairy products is a rare mode of TBEV infection in central Europe (4).

TBEV is a member of the family Flaviviridae, genus *Flavivirus*, which comprises several other important pathogens, including Yellow Fever virus (YFV), Japanese Encephalitis virus (JEV), Dengue virus (DENV) and West Nile virus (WNV). Flaviviruses are enveloped viruses with a linear, single-stranded, positive sense RNA genome of approximately 11,000 bases in length. Their genome encodes for a single polyprotein that is further processed into three structural (C, prM, E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (5).

The flaviviral non-structural protein 1 (NS1) is a highly conserved glycoprotein with a length of 352 amino acids and a weight of 46 to 55 kDa. (6–8) The NS1 protein occurs in different forms: as a dimer remaining intracellular, free in the cytoplasm, or membrane-associated, where it is important for viral replication by interacting with host proteins and the viral RNA. However, the exact mechanism remains to be elucidated (7, 9–11). In a hexameric form NS1 is also secreted into the extracellular space, inducing high levels of specific antibodies (12, 13). Finally, it is known that NS1 activates the Toll-like receptors (TLRs) and inhibits the complement system (8, 14, 15).

Tick-borne encephalitis (TBE) clinical disease often manifests a biphasic course with an nonspecific flu-like illness in the first viremic phase (3, 16). After an interval of a few days without symptoms, a second phase with

neurological symptoms may follow in one-third of patients (3, 4, 16). The direct detection of TBEV - either by isolation or by polymerase chain reaction (PCR) - is only successful in blood samples taken during the viremic phase of disease (16); however patients usually present to healthcare providers in the second (neurological) phase of disease. At that point, TBEV infection can only be diagnosed by serological antibody testing (16, 17). Consequently, TBE diagnostic and ECDC case definitions are based on the detection of TBEV specific antibodies by different commercially available enzyme linked immunosorbent assays (ELISA) (16) or indirect immune fluorescence assays (18).

TBE vaccination is the only effective way to prevent the disease, and vaccination is highly recommended by national and international public health organisations for residents and travellers in at-risk areas (1, 2, 19–22). In Germany, vaccination coverage varies from 10 to 50% in TBE risk areas (23). The overall efficacy of the available TBE vaccines after completing a basic vaccination schedule is >95% (2). However, every year up to 10% of all notified TBE cases have a history of irregular or incomplete vaccination (24) - even in the absence of a generally accepted definition, these cases could be interpreted as vaccination breakthrough infections (VBTs). Similar data have been reported from other high endemic European countries (25–29). Differentiating vaccine-induced antibodies from infection-induced antibodies has been difficult, but it is important to detect VBTs because of the mandatory requirement that they be reported as adverse events after vaccination. Besides these vaccine safety (VBT) and surveillance aspects, reliable epidemiological studies in TBEV-endemic regions with high vaccination rates have not been feasible for decades. Furthermore, antibodies against other flaviviruses (e.g. DENV, YFV) show strong cross-reactions in several serological test systems, which complicates the diagnosis of TBEV infections (30).

A new approach uses antibodies against NS1 as a diagnostic tool (31–33). The available vaccines (FSME Immun, Pfizer; Encepur, GSK) are highly purified and inactivated, without substantial amounts of NS1 (31, 34, 35). There is no TBEV replication and therefore no formation of NS1 protein and NS1 specific antibodies. In this study, we introduce data on a new anti-

TBEV NS1 IgG ELISA that was developed and validated according to European diagnostic quality standards (European Laboratory Norm DIN EN ISO 15189).

Materials and methods

Ethics Statement

This research was carried out in line with “The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)” and according to good clinical practice guidelines. In accord with local legislation, no formal approval by a research ethics committee was required, because either anonymous samples or sera for research purposes were used.

Definitions

TBE is a notifiable disease in many countries (European Centre of Disease Prevention and Control, ECDC). The German case definition for TBE (issued by the Robert Koch Institute, RKI) requires a combination of:

- a. Non-specific symptoms and/or central nervous system (CNS) symptoms indicating CNS infection (meningitis, encephalitis or myelitis).
- b. Laboratory confirmation of either simultaneously elevated TBEV-specific IgM and IgG antibodies in serum or cerebrospinal fluid (CSF), or a significant increase in TBEV-specific IgG antibodies in follow-up serum, or the detection of intrathecal antibody synthesis.

The detection of increased IgM TBEV-specific antibodies in serum was considered sufficient to meet the case definition until 2004. Note that the German case definition differs from the definition issued by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) in that the German definition also includes febrile forms without CNS symptoms (36).

Recombinant Protein

Recombinant NS1 protein was purchased from The Native Antigen Company, (TBEV-NS1-100). It is produced from 293 human cell lines, highly purified and presented in a hexameric, native folding state.

Study population and serum samples

We included a total of 188 anonymous serum samples from the National Consultant Laboratory for TBEV in our study. Samples were received between 2017 and 2019 from TBE patients, and from patients with other confirmed disease (including other flavivirus infections). In addition, samples from TBE vaccine recipients and patients vaccinated against other flaviviruses (YFV, JEV) were received for flavivirus diagnostics. Sera were stored at -80° C until use. Serum samples were divided into six different groups (see also Figure 1 and Supplementary Tables S1 - S6):

- Group 1 (N=71) included sera from patients with acute or recent TBEV infection; diagnosis was made using a commercial indirect immunofluorescence assay (IIFA; Flavi – Mosaik 1 Euroimmun AG, Luebeck, Germany) based on whole virus antigen for IgG and IgM antibodies.
- Group 2 (N=34) included sera from patients who tested TBEV and flavivirus infection negative by IIFA.
- Group 3 (N=49) included sera from TBE vaccinated patients (FSME Immun, Pfizer; Encepur, GSK) who, according to anamnestic information, had never suffered from TBE. All patients had a complete basic immunization and the last vaccine shot was more than three months before blood sampling.
- Group 4 (N=10) included sera from patients suffering from acute DENV infection (primary or secondary) or WNV infection (case ID 164) who tested positive for DENV/WNV specific IgM and IgG

antibodies by IIFA (Flavi – Mosaik 1 Euroimmun AG, Luebeck, Germany).

- Group 5 (N=20) included three sera from individuals who were vaccinated only against yellow fever (YF) and 16 sera from individuals who were vaccinated against YF and TBE (STAMARIL, Sanofi, Paris France, FSME Immun, Pfizer and/or Encepur, GSK). One sample from a patient vaccinated against JE was used (Ixario, Valneva Austria GmbH, Vienna, Austria). All patients had a complete basic immunization and the last vaccine shot was more than three months before blood sampling.
- Group 6 (N=4) included four sera from patients with a history of TBE five, 10, 23 and 28 years ago.

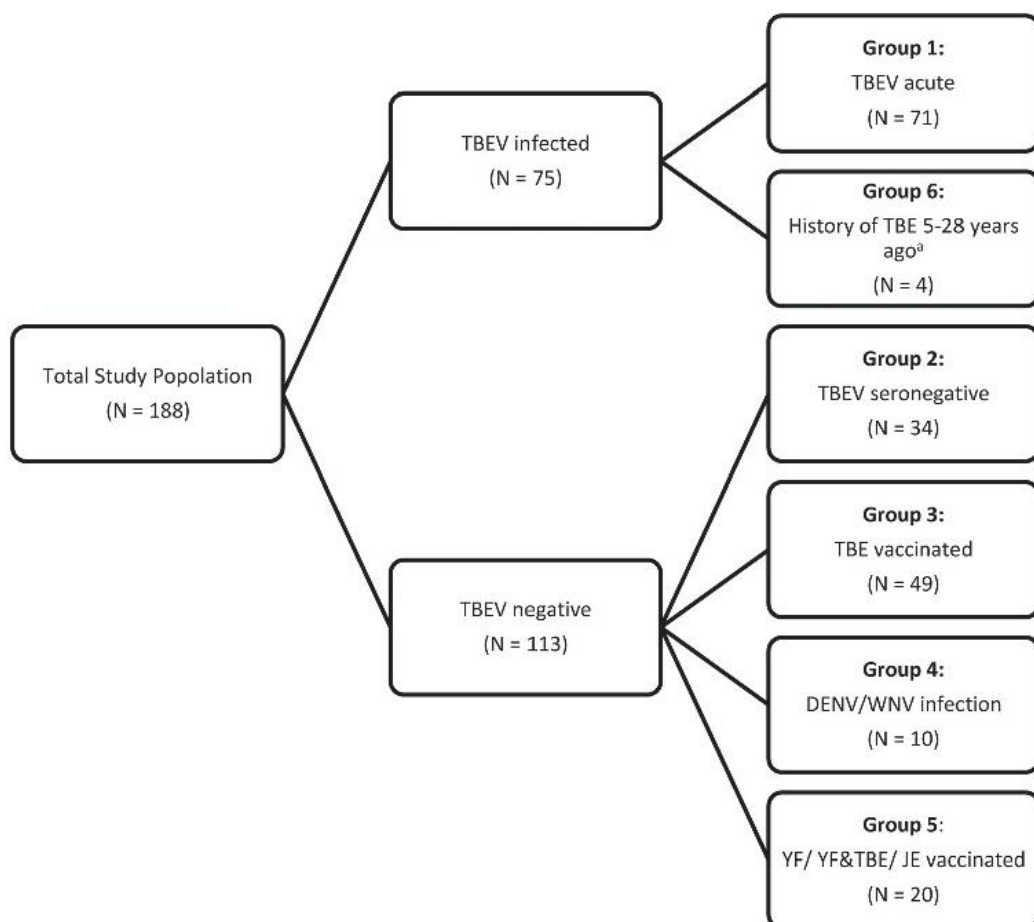


FIG 1 Study population. Samples from patients with a past TBEV infection, confirmed 5, 10, 23, and 28 years ago.

Anti-TBEV-NS1-IgG-ELISA

96-well polystyrene plates (Nunc Immuno MaxiSorp, Thermofisher, Waltham, Massachusetts, United States) were coated overnight at 4° C with TBEV NS1 recombinant antigen (The Native Antigen Company, TBEV-NS1-100) at a concentration of 0.25 µg/ml in carbonate buffer (0.6 M, pH 9.6). Wells were blocked with gelatine (PanReak AppliChem, Darmstadt, Germany) in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at room temperature, after which 100 µl of the test serum diluted 1:100 were added to each well and incubated for 1 h at 37° C. Plates were washed three times. 100 µl of horseradish peroxidase (HRP) conjugated detection antibody (polyclonal rabbit anti human IgG-HRP, Dako, Jena, Germany) were then added to each well and incubated for 1 h at 37° C. After three washing cycles with PBS-T, 100 µl of substrate tetramethylbenzidine (TMB; Substrate-Chromogen ready to use, Dako, Jena, Germany) were added for 6 minutes at room temperature. The reaction was terminated by adding 50 µl of 0.5 M sulfuric acid. The optical density (OD) was measured in an ELISA reader (Infinite F50, Tecan, Männedorf, Switzerland) at 450 nm, 620 nm reference. Positive and negative controls consisted of pooled serum samples with known anti TBEV IgG antibody levels, tested by IIFA (Flavivirus – Mosaik 1, Euroimmun AG, Luebeck, Germany).

To avoid false positive results, a cut-off control (YFC) was introduced during test establishment before starting the sensitivity and specificity studies. The YFC is the serum of a person, vaccinated against TBEV and YF and from a TBE non-endemic area, which showed the highest OD value of all YF vaccinees used in the pre-testing development. The YFC was also run as quality and specificity control in triplicates in every ELISA run to determine the threshold. The mean YFC OD plus one standard deviation was defined as the negative threshold. A YFC OD of higher than three standard deviations of YFC mean value was set as the positive threshold. Samples with an OD higher than the positive threshold of the mean YFC OD were considered positive. Samples with an OD lower than the YFC negative threshold OD were validated as negative. Samples with an OD in between mean YFC negative and positive threshold were considered borderline. All patients' sera and controls were tested in triplicate and interpreted as

positive or negative with respect to their mean OD.

Statistics

Sensitivity was calculated as the proportion of patients acutely ill with TBE (group 1) who were correctly identified as positive by the assay. Specificity was calculated as the proportion of samples from patients without a current or previous TBEV infection (groups 2 to 5) that tested negative in the assay.

Results

Sensitivity

Sensitivity was evaluated using 71 samples from patients acutely ill with TBE (group 1). Among these sera, 67 tested positive for NS1 specific IgG antibodies, resulting in a sensitivity of 94.37%. Two of these acute sera belonged to the same patient (case ID 32 and 36) - the second sample was drawn one week after the first one. The first sample tested negative, the second sample tested positive for NS1 specific IgG antibodies, reflecting the rise in IgG levels that occurs during the early stage of disease. Another sample taken at an early stage showed a weak positive reaction for TBEV IgM antibodies using IIFA, but a second specimen (case ID 49, which was tested in the NS1 IgG ELISA) was clearly positive in the IgM TBEV IIFA. One sample (case ID 10) showed a borderline OD in the NS1 IgG ELISA, compatible with early disease; unfortunately, no second sample from this patient was available. Excluding these three early stage samples, the sensitivity rises to 98.53% (see also Figure 2).

Specificity

Evaluation of specificity was performed by testing 34 TBEV samples confirmed to be negative for TBEV specific IgM or IgG antibodies by IIFA. Except for one serum, all specimens tested negative in the NS1 ELISA, corresponding to a specificity of 97.06%. Furthermore, 49 samples from individuals vaccinated against TBEV with verified IgG antibody titres were

tested. Although past TBE infection cannot be excluded, according to anamnestic information, these individuals never suffered from clinical TBE. All 49 sera showed no reaction in the NS1 IgG ELISA, corresponding to a specificity of 100%. To evaluate possible cross-reactions with other flaviviruses, 9 sera from patients acutely ill with DENV infection, one patient acutely ill with WNV infection, and 19 samples from patients vaccinated against YF were tested. With one exception, all DENV and WNV positive samples tested negative for NS1 specific IgG antibodies, indicating a specificity of 90.00%. The exceptional sample tested positive (case ID 156), showing a high OD (> 2.0) in the TBEV-NS1-ELISA consistent with current or recent TBEV infection. In addition, the IIFA titres for DENV and TBEV were almost equal (DENV 1:640 IgM/1:40960 IgG; TBEV 1:160 IgM/1:40960 IgG). Since this sample also reacted in TBEV IIFA, the possibility of an acute or recent TBEV infection cannot be ruled out. A possible explanation would be a misinterpretation of the IIFA results, where there was no DENV but a TBEV infection instead, or a co-infection with TBEV and DENV. Slight cross-reactivity occurred in YF vaccinated patients. Eight of the 19 tested sera showed weak reactivity in the TBEV NS1 ELISA, and after introducing a cut-off control (see below), four samples still tested positive, while one showed a borderline result. Thus, specificity within this group was only 73.68%. Results from the patient vaccinated against JE who tested negative in the NS1 ELISA might argue, that the JE vaccination does not seem to induce cross-reactive antibodies, but higher case numbers have to be analysed. Across all tested specimens, the overall specificity was 93.81%, accuracy was 94.02%, the positive and negative predictive values (PPV/NPV) were 90.54 % and 96.36%, respectively - (see also Table 1 and Figure 2).

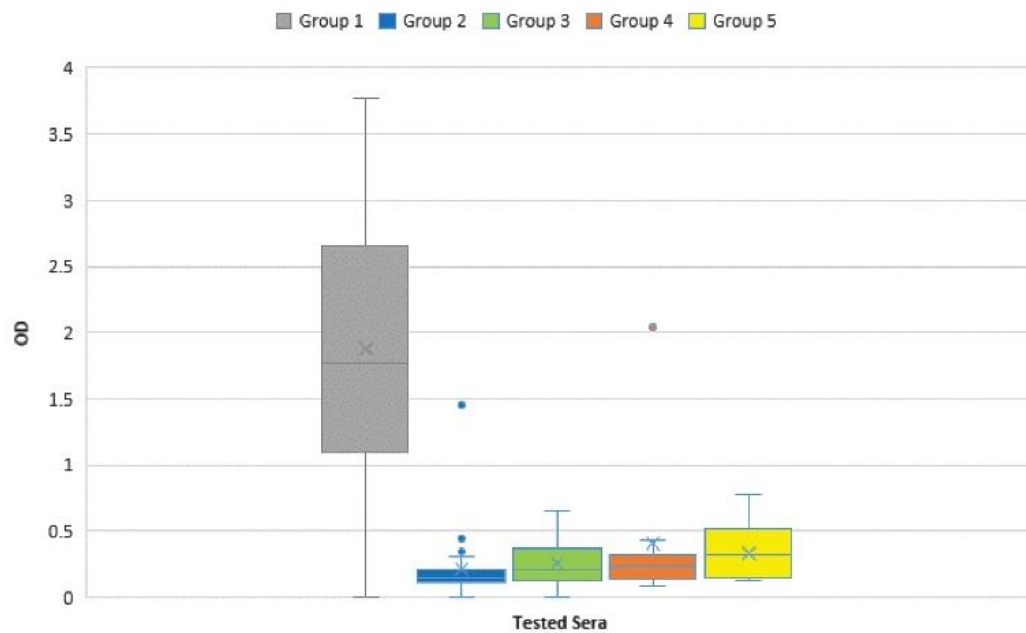


FIG 2 Optical density (OD) distribution within the tested serum groups. Group 1: IFFA confirmed TBEV infection ($n = 71$); Group 2: IFFA confirmed TBEV seronegative ($n = 34$); Group 3: TBE vaccinated ($n = 49$); Group 4: IFFA confirmed DENV/WNV infection ($n = 10$); Group 5: YF/YF and TBE/JE vaccination ($n = 20$). X, mean value; center line, median value.

Antibody persistence

The long-term persistence of TBEV NS1 specific antibodies in a pilot study was tested using sera from four patients with past confirmed TBE, five, 10, 23 and 28 years ago. After five years, the patient's sera still showed a high positive reaction in the NS1 IgG ELISA, corresponding to a high level of NS1 specific IgG antibodies. The sera of the patient suffering from TBE 10 years ago still showed a borderline OD, and the sample from the patient with TBEV 28 years ago yielded an OD just below the cut-off. The sample from a fourth patient with TBEV 23 years ago still showed a clear positive reaction in the NS1 ELISA. Due to the small number of tested sera, these results are have only indicative in character.

Discussion

The TBEV NS1-based diagnostic tool described here facilitates precise identification of TBEV infections and the differentiation of TBEV infection-induced specific antibodies from vaccine-induced antibodies. NS1 specific antibodies show hardly any cross-reactivity with other flaviviruses, and the rate of false positive results is greatly reduced (31–33, 37). Albinson et al.

established a TBEV NS1 based suspension multiplex immunoassay (SMIA) in 2017 enabling distinction between serological responses following TBEV infection versus TBE vaccination (31). In this study we present a diagnostic test for the qualitative measurement of TBEV specific IgG antibodies against TBEV NS1. Instead of the SMIA approach, we chose an ELISA format that can be easily applied in almost every diagnostic laboratory, without further equipment or additional training.

TABLE 1 Test performance

Test ^a	Percent for all sera (<i>n</i> = 187)	Percent without former patients (<i>n</i> = 184)
Sensitivity	94.37	93.33
Specificity	93.81	93.81
Precision/PPV	90.54	90.91
NPV	96.36	95.50
FPR	6.19	6.19
FNR	5.63	6.67
Accuracy	94.02	93.62

^aPPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; FPR, false-positive rate; FNR, false-negative rate.

In TBE diagnostics, cross-reactivity with other flaviviruses is a major problem. Commercially available test kits are based on the detection of specific antibodies against the whole TBEV virus (WV) and in particular against the structural E protein (envelope protein). Patients with other flavivirus infections (e.g. WNV, YFV or DENV) as well as vaccinated individuals (e.g. JE, YFV) may show cross-reactive antibodies, especially if a serological response of the secondary type (at least two flavivirus infections or vaccines) is present (18, 21, 38). TBE diagnosis is virtually impossible with such kits if a TBE vaccination is administered shortly before or after possible TBEV exposure. In these situations, IgG and IgM antibodies against TBEV may be detected, but it is unclear whether the antibodies are vaccine- or infection-induced. Commercial kits rely on antibody detection in CSF and determination of an autochthonous TBEV antibody production index. However, IgM antibodies after TBEV vaccination or infection may persist for weeks or even months and thus imitate the serological response of an acute infection (21, 39, 40). We focused on evaluating test characteristics in the context of cross-reactions with other flavivirus infections. Among the positive samples, sensitivity was found to be ~ 94%; four out of the 71 specimens tested negative with the new ELISA. For three of these four samples, negative results can be explained by the

fact, that the samples were obtained at very early stages of disease. In one case, we tested a second sample, drawn a week later, that yielded a positive result. Therefore, sensitivity seems to increase when samples are drawn several days after onset of neurological symptoms, and the analysis of paired serum samples further elevates sensitivity. These findings are in line with other published studies (31, 33, 37). In order to further investigate possible cross-reactions, we followed a classification of flaviviruses according to their NS1 protein sequence(41).

TBEV NS1 shows greatest homology to the NS1 protein of YFV (41). This might explain the low cross-reactivity in the TBEV NS1 ELISA of patients vaccinated against YF. A live vaccine is used for YF vaccination. YF vaccine virus replicates in vaccinees, and antibodies against YFV NS1 are formed that are very similar to what is seen in a natural YF infection. Three out of 19 samples were obtained from patients recently vaccinated against YF. These samples tested negative in the NS1 IgG ELISA. The other 16 samples were obtained from patients vaccinated against YF and TBE. The NS1 IgG ELISA showed low reactivity in eight of these cases, corresponding to a specificity of only 50%. To avoid false positive results due to YF vaccination, we established a cut-off control (=YFC) consisting of serum from a patient vaccinated against YF and TBE. Test results were rated positive only when the sample OD was higher than the mean value of the YFC plus three standard deviations. This enabled us to raise the specificity within this group of YF and TBE vaccinated patients to ~ 69%. However, some samples still showed an OD just above our YFC and were therefore incorrectly classified as positive. Further improvement of specificity would be possible by defining another cut-off control at the expense of sensitivity. For diagnostic use, low positive results should be viewed cautiously. If possible, a YF vaccination or YFV infection should be excluded. In some cases, an additional test (YF vs. TBE neutralisation assay) might help to clarify borderline results in the TBEV NS1 ELISA. However, in our experience the neutralization assay might also lack sufficient sensitivity to detect low antibody titres. In any case, a second sample taken within an interval of at least one week should be requested and a significant rise in

OD should be required for positive diagnosis in sera with low OD values und unknown YF vaccination status. For epidemiological purposes, increasing the threshold is the only means of preventing false positive results, since YFV contact cannot be excluded. In addition to clearly positive results, a high number of questionable results will occur in endemic areas, resulting from a) contact with another flavivirus or b) contact with TBEV in prior years. Further improvement of the test for this application is therefore needed.

Interestingly, the cross-reactivity of TBEV NS1 specific antibodies against other flaviviruses seems to be much lower than with the available commercial WNV ELISA assays, which have a specificity of only 14 - 81% (38). This can be explained by the low homology between flaviviral NS1 proteins compared to, for example, envelope (E) -protein. Only one out of nine DENV patients tested false positive, which indicates a specificity of ~ 89%. The false positive sample showed a strong OD (> 2.0) corresponding to a current or very recent TBEV infection. Because the other eight samples showed a low average OD value, cross-reactions with DENV would seem to be unlikely. We cannot exclude the possibility that the IIFA results were misinterpreted and the patient did not suffer from an acute DENV infection but from TBEV infection (alternatively there might have been a rare instance of TBEV/DENV co-infection). Due to a lack of further diagnostic methods and the anonymity of the sample, detailed source data verification was not possible. One tested WNV patient did not show a positive TBEV NS1 IgG ELISA result, providing the first preliminary evidence that WNV-NS1 might not cross-react. The JE vaccinated individual also did not show a positive NS1 IgG ELISA result - as expected, since an inactivated JE vaccine was used. For both these and other flavivirus infections, further studies with higher case numbers should be conducted on the cross-reactivity of NS1 specific antibodies.

Almost all IIFA confirmed seronegative samples were identified correctly. Only one IIFA negative specimen showed a positive result in the NS1 IgG antibody ELISA. This corresponds to a specificity of ~ 97%. Unfortunately, clinical information regarding this case was missing, so further investigation

was not possible. All 49 vaccinated patients without any clinical signs of a current TBEV infection or corresponding clinical history tested negative, resulting in a specificity of 100%. This result demonstrates the potential of our test to differentiate the antibody response after vaccination from antibody response after infection.

Another issue is the persistence of TBEV NS1 specific IgG antibodies. We tested four sera from patients who anamnестically suffered from TBE 5, 10, 23 and 28 years ago. TBEV NS1 specific antibodies are detectable and patients can be clearly distinguished from vaccinated or naive individuals. Even in the patient with reported disease from 28 years ago, TBEV NS1 specific IgG antibodies seemed still to be present – but only in the one case tested thus far. More samples will have to be tested, ideally, consecutive samples from the same patients over time, to further characterize TBEV NS1 specific IgG antibody dynamics. Our current understanding of the persistence of TBEV NS1 specific IgG antibodies is incomplete, and no conclusions can be drawn concerning the long-term validity of this test based on the data set at hand.

In conclusion, our TBEV NS1 ELISA (IgG) proved to be a very sensitive and specific tool for diagnosing TBEV infections. It can clearly distinguish between TBEV infected and TBE vaccinated patients and is much less susceptible to cross reactions with other flaviviruses than conventional assays. Moreover, it is a tool for epidemiological purposes, as it is not affected by TBE vaccination. Further studies will be necessary to determine the persistence of TBEV NS1 specific antibodies after TBEV infection. Additionally, greater numbers of potentially cross-reacting samples should be tested to confirm the robustness of our assay against cross-reactivity with other flaviviruses.

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2012. Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. ECDC [u.a.], Stockholm.
2. WHO. 2011. Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper.
3. Dumpis U, Crook D, Oksi J. 1999. Tick-Borne Encephalitis. *Clin Infect Dis* 28:882–890.
4. Valarcher JF, Häggglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Renström L, Zohari S, Leijon M, Chirico J. 2015. Tick-borne encephalitis. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot* 34:453–466.
5. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. *Annu Rev Microbiol* 44:649–688.
6. Mason PW. 1989. Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* 169:354–364.
7. Muller DA, Young PR. 2013. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* 98:192–208.
8. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. 2016. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J* 13.
9. Cervantes-Salazar M, Angel-Ambrocio AH, Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Hurtado-Monzon AM, Alcaraz-Estrada SL, Ludert JE, Del Angel RM. 2015. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology* 484:113–126.
10. JACOBS MG, ROBINSON PJ, BLETCHLY C, MACKENZIE JM, YOUNG PR. 2000. Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J*.
11. Winkler G, Randolph VB, Cleaves GR, Ryan TE, Stollar V. 1988. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* 162:187–196.
12. Cruz-Hernández SI de la, Flores-Aguilar H, González-Mateos S, López-Martínez I, Alpuche-Aranda C, Ludert JE, Angel RM del. 2013. Determination of Viremia and Concentration of Circulating Nonstructural Protein 1 in Patients Infected with Dengue Virus in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 88:446–454.
13. Gould EA, Buckley A, Barrett ADT, Cammack N. 1986. Neutralizing (54K) and Non-neutralizing (54K and 48K) Monoclonal Antibodies against Structural and Non-structural Yellow Fever Virus Proteins Confer Immunity

in Mice. *J Gen Virol* 67:591–595.

14. Avirutnan P, Hauhart RE, Somnuek P, Blom AM, Diamond MS, Atkinson JP. 2011. Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *J Immunol* 187:424–433.

15. Chen J, Ng MM-L, Chu JJH. 2015. Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection. *PLOS Pathog* 11:e1005053.

16. Holzmann H. 2003. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21:S36–S40.

17. Puchhammer-Stöckl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX. 1995. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* 4:321–326.

18. Sonnenberg K, Niedrig M, Steinhagen K, Rohwäder E, Meyer W, Schlumberger W, Müller-Kunert E, Stöcker W. 2004. State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against tick-borne encephalitis virus. *Int J Med Microbiol Suppl* 293:148–151.

19. Donoso Mantke O, Escadafal C, Niedrig M, Pfeffer M, on behalf of the Working group for collective. 2011. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Eurosurveillance* 16.

20. RKI. 2019. Epidemiologisches Bulletin 22. August 2019 / Nr. 34.

21. WHO. 2011. Background Document on Vaccines and Vaccination against Tickborne Encephalitis (TBE).

22. Zavadská D, Anca I, Andre F, Bakir M, Chlibek R, Čížman M, Ivaskeviciene I, Mangarov A, Mészner Z, Pokorn M, Prymula R, Richter D, Salman N, Šimurka P, Tamm E, Tešović G, Urbancikova I, Usonis V. 2013. Recommendations for tick-borne encephalitis vaccination from the Central European Vaccination Awareness Group (CEVAG). *Hum Vaccines Immunother* 9:362–374.

23. RKI. 2019. Epidemiologisches Bulletin 14. Februar 2019 / Nr. 7.

24. Robert-Koch-Institut R. 2019. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018 247.

25. Andersson CR, Vene S, Insulander M, Lindquist L, Lundkvist Å, Günther G. 2010. Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 28:2827–2831.

26. Bogovic P. 2015. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 3:430.

27. Hainz U, Jenewein B, Asch E, Pfeiffer K-P, Berger P, Grubeck-Loebenstien B. 2005. Insufficient protection for healthy elderly adults by

tetanus and TBE vaccines. *Vaccine* 23:3232–3235.

28. Paulke-Korinek M, Rendi-Wagner P, Kundi M, Laaber B, Wiedermann U, Kollaritsch H. 2009. Booster vaccinations against tick-borne encephalitis: 6 Years follow-up indicates long-term protection. *Vaccine* 27:7027–7030.

29. Stiasny K, Holzmann H, Heinz FX. 2009. Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs. *Vaccine* 27:7021–7026.

30. Holzmann H, Kundi M, Stiasny K, Clement J, McKenna P, Kunz C, Heinz FX. 1996. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *J Med Virol* 48:102–107.

31. Albinsson B, Vene S, Rombo L, Blomberg J, Lundkvist Å, Rönnerberg B. 2018. Distinction between serological responses following tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection vs vaccination, Sweden 2017. *Eurosurveillance* 23.

32. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, García N, Saborío S, Elizondo D, Mercado JC, Gonzalez K, Cerpas C, Nuñez A, Corti D, Waggoner JJ, Kuan G, Burger-Calderon R, Harris E. 2018. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. *J Clin Microbiol* 56.

33. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, Jaconi S, Camerini E, Saborio S, Rovida F, Percivalle E, Ijaz S, Dicks S, Ushiro-Lumb I, Barzon L, Siqueira P, Brown DWG, Baldanti F, Tedder R, Zambon M, de Filippis AMB, Harris E, Corti D. 2017. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci* 114:8384–8389.

34. GSK. 2019. Fachinformation ENCEPUR.

35. Pfizer. 2017. Fachinformation FSME-IMMUN.

36. Hellenbrand W, Kreusch T, Böhmer MM, Wagner-Wiening C, Dobler G, Wichmann O, Altmann D. 2019. Epidemiology of Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Germany, 2001–2018. *Pathogens* 8:42.

37. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, Schinkel J, Grobusch MP, Goorhuis A, Warnecke JM, Lattwein E, Komorowski L, Deerberg A, Saschenbrecker S, Stöcker W, Schlumberger W. 2016. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* 21.

38. Niedrig M, Vaisviliene D, Teichmann A, Klockmann U, Biel SS. 2001. Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *J Clin Virol* 20:179–182.

39. Hofmann H, Kunz Ch, Heinz FX, Dippe H. 1983. Detectability of IgM antibodies against TBE virus after natural infection and after vaccination. *Infection* 11:164–166.
40. Roggendorf M, Deinhardt F, Heinz F, Kunz CH. 1981. Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of antibodies of the IgM class. *J Med Virol* 7:41–50.
41. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. 2016. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* 23:456–458.

V. DISKUSSION UND AUSBLICK

1. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines NS1 basierten ELISAs zum Nachweis spezifischer IgG-Antikörper gegen das TBEV im Patientenserum. Der Test wurde im Anschluss an die Entwicklung entsprechend den Anforderungen der europäischen Norm DIN EN ISO 19185 für die Verwendung in akkreditierten Diagnostiklabors validiert und in der Routinediagnostik eingesetzt. Hier erwies sich der neue NS1-ELISA als gleichermaßen sensitiv und spezifisch. Der NS1-Test ermöglichte eine präzise Unterscheidung von Antikörpern nach einer TBEV-Impfung und Antikörpern nach einer echten TBEV-Infektion. Darüber hinaus zeigte der NS1-ELISA, im Gegensatz zu den bisher verfügbaren WV basierten Testsystemen, kaum Kreuzreaktionen gegen die getesteten anderen Flavivirusinfektionen bzw. -impfungen, wie YFV, WNV und DENV.

Bei der Wahl des Testverfahrens fiel die Entscheidung auf das klassische ELISA-Format, da dieses System in modernen Diagnostiklabors bereits gut etabliert und entsprechend weit verbreitet ist. Dadurch ist das Laborpersonal mit dem Testsystem vertraut und beherrscht die adäquate Durchführung ohne die Notwendigkeit weiterer Schulungen. Auch die technischen Anforderungen, wie die Verfügbarkeit von ELISA-Readern, sind überwiegend bereits vorhanden und müssen nicht eigens angeschafft werden. Zudem lässt sich das ELISA-Format in hohem Maße automatisieren, was neben einer hohen Standardisierbarkeit auch eine kosteneffiziente Testdurchführung erlaubt. Albinsson et al. (2018) entwickelten in ihrer Studie einen Suspension Multiplex Immunoassay (SMIA) zur Unterscheidung der Immunantwort nach Impfung und Infektion (Albinsson et al., 2018). Dieses System ermöglicht im Gegensatz zum klassischen ELISA die gleichzeitige Untersuchung einer Serumprobe auf das Vorhandensein von mehreren spezifischen Antikörpern. So kann gleichzeitig auf IgM und IgG Antikörper gegen WV und NS1 getestet werden. Dafür sind allerdings entsprechende Auswerteeinheiten, (z.B. LUMINEX™, Thermo Fisher) erforderlich, die bisher aber vorwiegend nur

in der Forschung zum Einsatz kommen. Bei der Verwendung von ELISA-Testsystemen müssen mehrere Tests parallel durchgeführt werden um die einzelnen Antikörper-Isotypen oder WH- und NS1-Antikörper unterscheiden zu können. Der damit verbundene Mehraufwand ist aber überschaubar und amortisiert die höheren Kosten des SMIA-Systems nicht. Eigene Versuche zur Nachweisbarkeit von NS1-spezifischen IgM-Antikörpern lassen zudem auf ein sehr enges zeitliches Fenster schließen, in dem ein erfolgsversprechender Nachweis überhaupt möglich ist. So scheinen die NS1 spezifischen IgM-Antikörper erst einige Zeit nach den WV-spezifischen Antikörpern anzusteigen und zum Zeitpunkt höherer IgG Titer bereits nicht mehr nachweisbar zu sein. In der Literatur finden sich nach eigenem Kenntnisstand bisher keine Angaben zur NS1-spezifischen Antikörperdynamik, entsprechende Studien sollten zukünftig durchgeführt werden. Da bei TBEV-Infektionen bisher lediglich auf eine symptomatische Therapie zurückgegriffen werden kann, (Kaiser, 2008, 2016; Lindquist and Vapalahti, 2008; Valarcher *et al.*, 2015) ist die schnelle Diagnose der TBE für die Behandlung der Patienten in der Regel nicht entscheidend. Daher kann bei unklaren IgG-Testergebnissen eine Verlaufsprüfung im Abstand von ein bis zwei Wochen Klarheit verschaffen, ohne dass der Nachweis NS1-spezifischer IgM-Antikörper erforderlich wäre. In Kombination mit herkömmlichen WV-Diagnostiktests kann die Aussagekraft zudem noch weiter erhöht werden. Zusammenfassend haben wir daher zum jetzigen Zeitpunkt auf die Etablierung eines validierten ELISAs zum Nachweis NS1-spezifischer IgM-Antikörper verzichtet. Für die Zika-Diagnostik wurden in den letzten Jahren ebenfalls NS1 basierte Tests für den Antikörpernachweis entwickelt, auch hier entschied man sich aus den oben genannten Gründen für die Nutzung einer ELISA-Plattform (Huzly *et al.*, 2016; Balmaseda *et al.*, 2017).

Für die Entwicklung und Validierung des neuen NS1-ELISAs wurden anonymisierte Seren verwendet, die aus ganz Deutschland zur Diagnostik auf Flaviviren an den Diagnostikbereich eingesendet worden waren. Durch die Anonymisierung war bei den meisten Seren nicht mehr genau nachzuvollziehen, zu welchem Zeitpunkt nach Auftreten der Krankheitssymptome die Probe entnommen worden war. Alle

Einsendungen stammten jedoch von Patienten, die zum Zeitpunkt der Probennahme bereits symptomatisch erkrankt waren, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine entsprechende Antikörperbildung bereits eingesetzt hatte. Zudem wurden alle Proben vor ihrer Verwendung im NS1-Test auch mit IIFA, der bisher verwendeten Referenzmethode, charakterisiert. Seren von TBEV-geimpften Patienten wurden dabei positiv auf TBEV-spezifische IgG-(Impf-)Antikörper und negativ auf IgM-Antikörper getestet. Anamnestisch hatten alle untersuchten Impflinge noch nie eine akute TBE-Infektion durchlaufen. Mit den bisher verfügbaren Untersuchungsmethoden ist ein definitiver serologischer Ausschluss einer früheren TBE-Erkrankung jedoch nicht möglich. Ähnlich verhält es sich bei den untersuchten Seren von Patienten mit anderen Flavivirusinfektionen oder –lebendimpfungen. Durch Kreuzreaktivität war ein definitiver Ausschluss einer früheren TBEV-Infektion nicht möglich, auch hier erfolgte die Auswahl auf anamnestischer Basis.

Momentan wird das benötigte NS1-Protein für die Herstellung der ELISA-Platten kommerziell von der The Native Antigen Company erworben. Das rekombinante Protein wird mit integriertem His-tag in HEK-293-Zellen produziert und anschließend in der SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgereinigt. Das NS1 liegt als Hexamer in seinem natürlichen Faltungszustand vor. Bei der Wahl des Antigens wurde die Beschaffung des kommerziell verfügbaren NS1 der eigenen Herstellung vorgezogen, da der neue NS1-ELISA zukünftig auch anderen Diagnostiklabors zur Verfügung gestellt werden soll. Falls die Möglichkeit zur eigenen NS1-Produktion in anderen Diagnostiklabors überhaupt besteht, wäre eine dortige Etablierung des NS1-ELISA dennoch mit bedeutend größerem Aufwand und hohen Kosten verbunden. Das würde dem beabsichtigten Ziel, ein einfaches und kostengünstiges Diagnostiksystem anzubieten, entgegenstehen. Auch Albinsson et al. (2018) nutzen für ihren TBEV-SMIA das NS1-Protein der The Native Antigen Company. Die Verwendung des kommerziellen Proteins hat allerdings den Nachteil, dass momentan nur das NS1 des TBEV-Stammes Neudörfl, dem Prototypen des TBEV-EU, auf dem Markt verfügbar ist. Zwischen den Subtypen TBEV-EU und TBEV-FE und in geringerer

Ausprägung auch zwischen TBEV-EU/-FE und TBEV-Sib ist eine gewisse Kreuzimmunität beschrieben (Holzmann *et al.*, 1992; Orlinger *et al.*, 2011; Fritz *et al.*, 2012; Valarcher *et al.*, 2015). Inwieweit diese Kreuzimmunität/Kreuzreaktivität auch für die NS1-spezifischen Antikörper besteht, muss in kommenden Untersuchungen ermittelt werden. Dazu wird ein Vergleich der Antikörperreaktion auf NS1-Proteine unterschiedlicher Subtypen erforderlich und damit auch, in Ermangelung kommerziell verfügbarer Proteine, die eigene NS1-Herstellung für die Subtypen TBEV-FE und –Sib. In diesem Rahmen könnte auch ein Vergleich von selbst produzierten NS1 (TBEV-EU) mit dem Protein der The Native Antigen Company interessant sein.

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 188 Patientenseren mit dem neuen NS1-ELISA untersucht. Bei 67 von den 71 akut TBE-kranken Patienten ergab der NS1-ELISA ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von ca. 94,4% entspricht. Der TBEV-SMIA zeigte mit 86% eine etwas schlechtere Sensitivität (Albinsson *et al.*, 2018), vergleichbare Studien mit NS1-basierten Zika-ELISAs ergaben Sensitivitätsraten von 60% (Huzly *et al.*, 2016), 79% (Lustig *et al.*, 2017), 88,2% (Steinhagen *et al.*, 2016) bis hin zu 95% (Balmaseda *et al.*, 2017). Der Vergleich von sechs herkömmlichen, WV-basierten ELISAs zum Nachweis von TBEV-spezifischem IgG ergab Sensitivitätsraten von 73 bis 99% (Niedrig *et al.*, 2001). Der neue NS1-ELISA liefert also in Bezug auf die erreichte Sensitivität vergleichbare Ergebnisse. Betrachtet man allerdings die Spezifität der sechs konservativen ELISAs konnten nur Werte zwischen 14 bis 81% erreicht werden (Niedrig *et al.*, 2001). Zu beachten ist hier auch, dass die Testsysteme mit der besten Sensitivität (99 und 92%) eine nur geringe Spezifität von 14 und 46% erreichen konnten. Der neue NS1-ELISA erreichte eine Spezifität von 93,8%, trotz der ebenfalls hohen Sensitivität von 94,4%.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, mit dem neu etablierten NS1-ELISA die Unterscheidung von Impf- und Infektionsantikörpern zu ermöglichen. Diese Möglichkeit besteht in der konservativen TBE-Diagnostik bisher nicht, da sie auf dem Nachweis von WV-spezifischen Antikörpern basiert, die gegen virale Strukturproteine gerichtet sind. Die verfügbaren Totimpfstoffe

enthalten Formalin-inaktiviertes TBE-Vollvirus, sodass TBEV-Impflinge die gleichen Antikörper bilden wie TBEV-infizierte Patienten (WHO, 2011b). NS1 wird hingegen nur während der Virusreplikation bei einer echten TBEV-Infektion gebildet und ist in den Impfstoffen nicht enthalten. Der Nachweis NS1-spezifischer Antikörper ist also beweisend für eine akute oder zurückliegende echte TBEV-Infektion (Albinsson *et al.*, 2018). Damit ergeben sich völlig neue Möglichkeiten für die Diagnostik, die auch direkten Einfluss auf das öffentliche Gesundheitswesen haben. Das Konsiliarlabor erhält beispielsweise häufig Seren von Patienten mit TBE-Verdacht, die direkt nach einem Zeckenstich erstmalig geimpft wurden und dennoch nach einiger Zeit neurologische Symptomatik entwickeln. Nach einmaliger Impfung, auch unmittelbar nach dem Zeckenstich, ist für den betreffenden Patienten kein ausreichend hoher Impfschutz zu erwarten, um eine Infektion verhindern zu können (Bröker and Kollaritsch, 2008). Gleichzeitig ist die TBE-Diagnostik im Falle anschließend auftretender Symptomatik durch die Impfantikörper, wenn überhaupt, nur stark eingeschränkt möglich (Stiasny *et al.*, 2009). Das Robert-Koch-Institut (RKI) hatte dies in seinen Impfeempfehlungen berücksichtigt und bislang von einer Erstimpfung direkt nach Zeckenstich abgeraten. Trotzdem kann es sinnvoll sein, direkt nach einem Zeckenstich mit der Grundimmunisierung zu beginnen, obwohl die Diagnostik im Falle eines anschließenden TBE-Verdachts erschwert ist, wenn der Patient sich weiterhin in einem Risikogebiet aufhält und dadurch weitere Stiche infizierter Zecken wahrscheinlich sind (Robert-Koch-Institut, 2019a). So lässt sich möglicherweise wertvolle Zeit beim Aufbau eines künftigen Impfschutzes für Patienten in Risikogebieten einsparen. Durch den neuen NS1-ELISA stellen Impfantikörper kein diagnostisches Hindernis mehr dar. Entsprechend hat auch das RKI seine Empfehlungen bezüglich Impfung nach Zeckenstich in diesem Jahr erneuert und rät Patienten in Risikogebieten ab sofort zu einer Impfung auch direkt nach einem Zeckenstich (Robert-Koch-Institut, 2019a). In der vorliegenden Studie konnte die Fähigkeit der NS1-basierten TBE-Diagnostik, Impf- und Infektionsantikörper zu unterscheiden, klar belegt werden. Keines der 49 getesteten Seren von Impflingen zeigte im NS1-ELISA eine positive Reaktion. Damit konnten auch die Ergebnisse der Studie aus Schweden bestätigt werden. Hier reagierten nur drei der 150 getesteten Seren (von 50

Impflingen) positiv im NS1-SMIA (Albinsson *et al.*, 2018).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung des neuen NS1-ELISAs auf seine Resistenz gegenüber potentiell kreuzreaktiven Seren. Antikörper nach Flavivirus-Infektionen oder –Impfungen zeigen untereinander zum Teil extrem starke Kreuzreaktivität in den serologischen Diagnostiktests (Holzmann *et al.*, 1996; WHO, 2011a). Bei den sechs von Niedrig *et al.* (2001) untersuchten, konservativen TBE-Diagnostiktests konnten auf Grund von Kreuzreaktionen nur Spezifitätsraten von 14 bis 81% erreicht werden. Vor allem bei Seren von DEN-Patienten reagierten die TBE-Tests bei bis zu 100% der Seren falsch positiv (Niedrig *et al.*, 2001). Ähnliche Probleme durch Kreuzreaktionen treten auch in der Diagnostik anderer Flavivirusinfektionen auf (Balmaseda *et al.*, 2018). Der neue NS1-ELISA zeigte über alle untersuchten Seren eine Spezifität von 93,8%. Bei den zehn akuten DEN-Patienten lag die Spezifität bei 89%, da ein Serum eine stark positive Reaktion im NS1-ELISA zeigte. Wie oben beschrieben, lag die OD dieses Serums fast zehnfach über dem Durchschnitt der neun anderen DEN-Seren und ergab auch in der IIFA sehr ähnliche Titer für TBEV und DENV. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der im TBEV-NS1-ELISA positiv reagierende DEN-Patient kurz zurückliegend oder akut auch mit TBEV infiziert war. Eine Kreuzreaktivität erscheint bei den vorliegenden Ergebnissen unwahrscheinlich. Auch eine Untersuchung zur Homologie der NS1-Proteinsequenz zwischen verschiedenen Flaviviren attestiert zwischen TBEV und DENV die von allen untersuchten Flaviviren geringste NS1-Homologie, was Kreuzreaktionen weniger wahrscheinlich macht (Song *et al.*, 2016). Weitere untersuchte DEN-Patientenseren, die nach Fertigstellung der vorliegenden Studie untersucht worden waren, zeigten ebenfalls keine positive Reaktion im NS1-ELISA. Dennoch sollten weitere Untersuchungen folgen, um die Stabilität des NS1-ELISAs gegenüber DENV-Antikörpern zu bestätigen. Die größte Homologie in Bezug auf das NS1 besteht zwischen TBEV und YFV (Song *et al.*, 2016). Bei den 20 untersuchten Seren von YFV-Impflingen zeigte der neue NS1-ELISA schwach positive Reaktionen, die aber eine immer noch deutliche Abgrenzung zu akuten TBE-Patienten zuließen. Eine Verbesserung der Spezifität in Bezug auf YFV-positive Seren könnte durch die Verwendung

monoklonaler Antikörper in einem Blockade-Of-Binding-ELISA (BOB-ELISA) erreicht werden, wie er für die Zika-Diagnostik entwickelt wurde (Balmaseda *et al.*, 2017). In diesem Zika-BOB-ELISA kommen markierte monoklonale Antikörper zum Einsatz, die spezifisch an einen Bereich der NS1-Oberfläche binden, der nicht Zielstruktur kreuzreaktiver Antikörper ist. Gemessen wird dann die Verdrängung der monoklonalen Antikörper durch spezifische Antikörper gegen Zika-NS1. Für den TBEV-SMIA sind bislang noch keine Daten zur Kreuzreaktivität veröffentlicht worden, sodass für die NS1-basierte TBE-Diagnostik momentan keine Vergleichsdaten vorliegen. Orientierenden Charakter hat das negative Ergebnis des einen WNV-Patienten im neuen NS1-ELISA. Im Rahmen der vorliegenden Studie waren keine weiteren WNV-Patienten verfügbar, sodass dringend weitere Daten in Bezug auf Kreuzreaktionen mit WNV-Patienten erhoben werden sollten. WNV ist auch vor dem Hintergrund steigender Fallzahlen in Deutschland von besonderem Interesse. So stellte das nationale Referenzlabor für WNV-Infektionen am Friedrich-Löffler-Institut (FLI) von Juli bis September 2019 bei fünf Pferden und 37 Vögeln eine positive WNV-Diagnose (Robert-Koch-Institut, 2019b). In diesem Jahr konnten auch erste autochthone humane Fälle von WNV-Infektionen in Deutschland diagnostiziert werden (R. Robert-Koch-Institut, 2019a). Nachdem bereits 2018 erste WNV-Fälle in Deutschland aufgetreten waren, kann davon ausgegangen werden, dass sich das Virus erfolgreich in heimischen Stechmücken etabliert hat und in den kommenden Jahren weitere humane Fälle folgen werden (Robert-Koch-Institut, 2019b). Darüber hinaus sollten weitere Untersuchungen potentiell kreuzreagierender Seren mit höheren Fallzahlen ergänzend durchgeführt werden, um die Aussagekraft des neuen NS1-ELISAs noch besser einschätzen zu können. Dabei sollten auch bislang nicht untersuchte, aber im Hinblick auf potentiell kreuzreagierende Antikörper relevante Infektionskrankheiten untersucht werden. Beispielsweise kann hier die Infektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV) genannt werden, ebenfalls ein Virus aus der Familie der *Flaviviridae*. Die HCV-Erkrankung verläuft fast immer chronisch, sodass über lange Zeit ein ständiger Booster der Immunantwort bestehen bleibt (Lauer and Walker, 2001). In einer Studie zum neuen Zika-NS1-ELISA wurden auch HCV-Patientenserum auf Kreuzreaktionen getestet, die im Test aber nicht reagierten (Huzly *et al.*,

2016).

Ein letzter wichtiger Punkt in der NS1-basierten Diagnostik ist die Ermittlung der Dynamik NS1-spezifischer Antikörper im Krankheitsverlauf. WV-spezifische IgM-Antikörper sind fast immer bereits zu Beginn der neurologischen Phase im Patientenserum zu finden und bleiben in der Regel für etwa sechs Wochen nachweisbar (Holzmann, 2003; Dobler *et al.*, 2018). Auch eine Persistenz der IgM-Antikörper bis zu neun Monate ist beschrieben (Roggendorf *et al.*, 1981; Hofmann *et al.*, 1983; Holzmann, 2003). Zur Nachweisbarkeit NS1-spezifischer IgM-Antikörper ist bisher wenig bekannt. Bei der Untersuchung von 50 TBE-Akutseren im TBEV-SMIA zeigten alle Patienten eine WV-IgM-Reaktion, aber nur 46 von 50 Patienten auch eine NS1-spezifische IgM-Reaktion (Albinsson *et al.*, 2018). Wie bereits oben erwähnt, ergaben auch eigene Versuche zur NS1-spezifischen IgM-Nachweisbarkeit (die nicht in der vorliegenden Studie enthalten sind) negative NS1-Befunde bei gleichzeitig positiver WV-IgM-Nachweisbarkeit. Dies könnte darauf hindeuten, dass die NS1-spezifische Antikörperreaktion im Vergleich zur WV-spezifischen Reaktion etwas verzögert einsetzt. Bei einer Untersuchung von TBE-Patienten mit Verdacht auf Impfversagen zeigten alle 14 Patienten positive WV-IgM und -IgG-Antikörpertiter, bei nur zehn Patienten war jedoch der NS1-IgM-Nachweis im Serum erfolgreich (Albinsson *et al.*, 2019). Für die NS1-IgM-negativen Patienten wurden bei Albinsson *et al.* (2018) keine Verlaufsproben untersucht, sodass nicht bekannt ist, ob diese Patienten zu einem späteren Zeitpunkt NS1-IgM-Antikörper bildeten. Auch WV-spezifische IgG-Antikörper sind bei fast allen Patienten bereits zu Beginn der neurologischen Phase nachweisbar, erreichen ihren Höhepunkt ca. 6 Wochen nach Krankheitsbeginn und persistieren ein Leben lang (Holzmann, 2003; WHO, 2011a). In der vorliegenden Studie ergab der NS1-ELISA bei drei akut erkrankten Patienten mit entsprechend positiven WV-IgM und -IgG-Befunden ein negatives Ergebnis. Bei einem Patienten lag ein Verlaufsserum vor das im NS1-ELISA positiv reagierte, für die anderen beiden Seren waren keine Verlaufsseren verfügbar. Bei allen drei NS1-negativen Seren deuteten die WV-Titer jedoch auf ein frühes Krankheitsstadium hin. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass

auch die NS1-spezifische IgG-Titer später als die WV-Titer ansteigen. Die Ergebnisse von Albinsson *et al.* (2018) unterstützen diese These. Hier hatten alle 50 Akutpatienten WV-IgG-Titer, bei sieben Patienten waren jedoch keine NS1-spezifischen IgG-Antikörper nachweisbar (Albinsson *et al.*, 2018). Auch in der Studie des Zika-NS1-ELISAs finden sich entsprechende Hinweise. So lag die Sensitivität bei der Verwendung von Patienten >10 Tage nach Einsetzen der Symptome bei 91,8% und konnte bei Verwendung von Patienten >20 Tage nach Krankheitsbeginn auf 95% erhöht werden (Balmaseda *et al.*, 2017). Insgesamt sind derzeit aber nicht genug Daten verfügbar, um definitive Aussagen zur Titerentwicklung NS1-spezifischer IgG-Antikörper treffen zu können. Gleiches gilt auch für die Persistenz NS1-spezifischer Antikörper. In der vorliegenden Studie konnten vier Seren von Patienten mit länger zurückliegender TBE untersucht werden. Hier ergab der NS1-ELISA auch noch im Falle der 28 Jahre zurückliegenden TBE eine schwach positive Reaktion, die nach momentanen Maßstäben als grenzwertiges Ergebnis gewertet werden muss. Subklinische TBEV-Reinfektionen können hier jedoch ebenso wenig ausgeschlossen werden, wie subklinische Infektionen mit anderen Flavivirus-Infektionen, die kreuzreagieren könnten. Für die weitere Erschließung der NS1-Antikörperdynamik, insbesondere ab wann und wie lange die Antikörper nachweisbar sind, sollten zukünftig unbedingt weitere Studien mit definierten Entnahmezeiten im Krankheitsverlauf und nach Rekonvaleszenz durchgeführt werden.

2. Ausblick

Seit Einführung der TBEV-Impfung in den 1970er Jahren war die Erhebung echter epidemiologischer Daten zur Prävalenz der TBE in Europa nicht mehr möglich. Impfantikörper machten es unmöglich, über serologische Untersuchungen in repräsentativen Bevölkerungsgruppen Rückschlüsse auf die Häufigkeit von TBE-Infektionen ziehen zu können. Mit der NS1-basierten TBE-Diagnostik werden echte Prävalenzstudien durch die eindeutige Unterscheidbarkeit von Impf- und Infektionsantikörpern zukünftig wieder möglich sein. Um den NS1-ELISA für epidemiologische Fragestellungen effizient und aussagekräftig einsetzen zu können, sollten weitere Untersuchungen die hohe Spezifität des Testes gegenüber anderen Flavivirus-Infektionen bestätigen. Weiterhin ist es wichtig, genauere Kenntnis über die Langzeit-Nachweisbarkeit NS1-spezifischer IgG-Antikörper zu gewinnen. Für epidemiologische Fragestellungen ist momentan der relativ hohe Cut-Off des NS1-ELISAs limitierend, der den leichten Kreuzreaktionen mit YFV-positiven Seren geschuldet ist. Bei lange zurückliegenden TBEV-Infektionen sinken die IgG-Titer vermutlich auf ein OD-Niveau, wie es auch die Kreuzreaktionen mit YFV erreichen. Abhilfe könnte hier ein analog aufgebauter YFV-NS1-ELISA schaffen. Sollten mit einem solchen Test ähnlich hohe Sensitivitäts- und Spezifitätsraten erzielt werden, könnte ein negatives YFV-NS1-ELISA Ergebnis eine vorangegangene YFV-Impfung oder –Infektion ausschließen. Auch schwache TBEV-NS1-Reaktionen könnten dann sicher einer echten TBEV-Infektion zugeschrieben werden und der Cut-Off zu Gunsten einer weiter verbesserten Sensitivität gesenkt werden. Gute Erfahrungen mit der NS1-basierten Diagnostik, auch für Zika-Infektionen, lassen entsprechend hoffen.

Durch eine einfache Modifikation des Sekundärantikörpers kann der NS1-ELISA auch in der Veterinärmedizin eingesetzt werden. Durch die Verwendung von Protein A oder G könnte ein All-Species-ELISA etabliert werden, wie er kommerziell bereits für die WV-Antikörperdetektion im Veterinärbereich verfügbar ist (Progen, 2018). Alternativ könnte auch durch speziesspezifische Sekundärantikörper ein tierartspezifischer NS1-ELISA für besonders relevante Tierarten aufgestellt werden. Durch die niedrigen

Zahlen symptomatischer TBE-Erkrankungen wird die TBE-Diagnostik in der Veterinärmedizin sicherlich eine untergeordnete Rolle spielen. Interessant könnte aber die Nutzung des NS1-ELISAs für das TBEV-Monitoring sein. Verschiedene Studien belegen die hervorragende Eignung des TBEV-Monitorings in Tierpopulationen zur Risikobewertung, insbesondere in Gebieten mit geringer Bevölkerungsdichte oder hohen Impfraten (Rieger *et al.*, 1999; Klaus *et al.*, 2010, 2012; Achazi, Růžek, *et al.*, 2011; Duscher *et al.*, 2015; Tonteri *et al.*, 2016; Rieille *et al.*, 2017). Die NS1-basierte Diagnostik hätte auch hier den Vorteil der deutlich geringeren Anfälligkeit für Kreuzreaktionen mit anderen Flavivirus-Infektionen. Hier sei wiederum das WNV als Beispiel genannt, das sich durch klimatische Veränderungen zunehmend auszubreiten und, vor allem in den Tierpopulationen, auch bereits in Deutschland etabliert zu haben scheint (R. Robert-Koch-Institut, 2019a, 2019b). Erste Versuche mit Protein A zur Untersuchung von Tierseren ergaben bereits interessante Ergebnisse. Dabei wurden in der IIFA positiv auf TBEV-spezifische IgG-Antikörper getestete Seren im neuen NS1-ELISA untersucht. Interessanterweise gelang die Bestätigung der positiven Seren von Wildschweinen und Hunden problemlos. Füchse und Mäuse reagierten dagegen durchwegs negativ, obwohl sie vergleichbare Antikörpertiter in der IIFA zeigten. Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass Reservoirwirte keine oder eine stark abweichende NS1-Immunantwort ausbilden, was im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der TBEV-Naturherde stehen könnte. Bei der Klärung dieser sicherlich spannenden Hypothese dürfte der NS1-ELISA ebenfalls einen wichtigen Beitrag leisten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis (tick-borne encephalitis, TBE) ist die derzeit wichtigste, vektorübertragene, Virusinfektion Europas. Ihr Erreger ist das Tick-borne encephalitis virus (TBEV) aus der Familie der *Flaviviridae*, das durch Zecken, hauptsächlich *Ixodes* spp., übertragen wird. TBE wurde 1931 erstmals in Österreich beschrieben und ist heute in weiten Teilen Europas, in Teilen Russlands, Nordchina und Japan endemisch. Für die TBE ist keine kausale Therapie bekannt, wirksamen Schutz bietet jedoch die aktive Immunisierung mit den verfügbaren Totimpfstoffen. Die TBE-Diagnostik basiert vor allem auf dem serologischen Nachweis TBEV-spezifischer Antikörper. Die mangelnde Unterscheidbarkeit von Impf- und Infektions-Antikörpern sowie eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit anderen Flavivirus-Infektionen oder –Impfungen stellen momentan die größten Herausforderungen in der TBE-Diagnostik dar. In der vorliegenden Studie wurde ein neuer TBEV-Antikörper-ELISA auf Basis des Nichtstruktur-Proteins-1 (NS1) vorgestellt. Der neue ELISA wurde entsprechend der Vorgaben der europäischen Norm DIN EN ISO 15189 für den Einsatz in akkreditierten Diagnostiklabors validiert. Dabei wurden Sensitivität und Spezifität, vor allem im Hinblick auf die Unterscheidung von Impf- und Infektionsantikörpern sowie die Resistenz gegenüber potentiell kreuzreagierenden Patientenseren ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass der neue NS1-ELISA eine sichere Differenzierung von Antikörpern nach Impfung und Antikörpern nach echter TBEV-Infektion erlaubt und darüber hinaus deutlich stabiler gegenüber Kreuzreaktionen ist. Damit lieferte der neue ELISA eine gleichermaßen gute Sensitivität und Spezifität. Das neue Diagnostikverfahren eignet sich durch die beschriebenen Merkmale hervorragend für die Untersuchung fraglicher Impfdurchbrüche/Impfversager sowie die Diagnostik bei Patienten, die bereits Kontakt mit anderen Flavivirus-Infektionen oder –Impfungen hatten. Ebenso ermöglicht der neue NS1-ELISA erstmals seit Einführung der TBEV-Impfung wieder die Bearbeitung epidemiologischer Fragestellungen auf Basis spezifischer, serologischer Daten.

VII. SUMMARY

Tick-borne encephalitis (TBE) is the most important vector transmitted viral infection in Europe. The disease is caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV), a member of the family Flaviviridae. This virus is transmitted by ticks, mainly *Ixodes* spp. TBE was described for the first time in 1931 in Austria and is today endemic in large parts of Europe, Russia, North China and Japan. For TBE there is no causal treatment known but the available inactivated vaccines provide good protection.

TBE-diagnosis is mainly based on the serological detection of specific antibodies against TBEV. So far, the core challenges in TBE-diagnosis are the lack of distinguishability between vaccination induced and infection induced antibodies and the strong cross-reactivity with other flaviviral infections or vaccinations.

In this study a new TBEV antibody ELISA based on the non-structural protein 1 (NS1) was presented. The new ELISA was validated for use in accredited diagnostic laboratories according to the European norm DIN EN ISO 15189. Thereby, sensitivity and specificity were determined, especially in view of the differentiation between vaccination induced and infection induced antibodies as well as the robustness against potentially cross-reacting patient's sera. It has been shown that the new NS1-ELISA enables a reliable differentiation between antibodies following TBE-vaccination and antibodies following TBEV-infection and is furthermore much more resistant against cross-reactions. Thereby, the new ELISA provides high sensitivity along with high specificity, too.

This new diagnostic tool is outstanding and suitable for the differentiation of questionable cases of vaccination breakthrough infections/vaccination failure as well as the examination of patients with contact to other flavivirus infections or flavivirus vaccinations. Additionally, for the first time since the introduction of the TBE-vaccination, working on epidemiological issues based on serological data will be possible with the new NS1-ELISA again.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Achazi, K., Nitsche, A., Patel, P., Radonić, A., Mantke, O.D. & Niedrig, M. (2011) 'Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing', *Journal of Virological Methods*, 171, 34–39.

Achazi, K., Růžek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Ali, H.S., Wenk, M., Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Rühle, F., Vor, T., Kiffner, C., Kallies, R., Ulrich, R.G. & Niedrig, M. (2011) 'Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11, 641–647.

Albinsson, B., Rönnerberg, B., Vene, S. & Lundkvist, Å. (2019) 'Antibody responses to tick-borne encephalitis virus non-structural protein 1 and whole virus antigen—a new tool in the assessment of suspected vaccine failure patients', *Infection Ecology & Epidemiology*, 9, 1696132.

Albinsson, B., Vene, S., Rombo, L., Blomberg, J., Lundkvist, Å. & Rönnerberg, B. (2018) 'Distinction between serological responses following tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection vs vaccination, Sweden 2017', *Eurosurveillance*, 23.

Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V. & Flamand, M. (2002) 'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections', *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 376–381.

Allison, S.L., Ecker, M., Meixner, T. & Heinz, F.X. (1999) 'Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia.', *Journal of General Virology*, 80, 179–185.

Amberg, S.M., Nestorowicz, A., McCourt, D.W. & Rice, C.M. (1994) 'NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies.', *Journal of Virology*, 68, 3794–3802.

Andersson, C.R., Vene, S., Insulander, M., Lindquist, L., Lundkvist, Å. & Günther, G. (2010) 'Vaccine failures after active immunisation against tick-borne encephalitis', *Vaccine*, 28, 2827–2831.

Avirutnan, P., Hauhart, R.E., Somnuk, P., Blom, A.M., Diamond, M.S. & Atkinson, J.P. (2011) 'Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation', *The Journal of Immunology*, 187, 424–433.

Avirutnan, P., Punyadee, N., Noisakran, S., Komoltri, C., Thiemmea, S., Auethavornanan, K., Jairungsri, A., Kanlaya, R., Tangthawornchaikul, N., Puttikhunt, C., Pattanakitsakul, S., Yenchitsomanus, P., Mongkolsapaya, J., Kasinrer, W., Sittisombut, N., Husmann, M., Blettner, M., Vasanawathana, S., Bhakdi, S. & Malasit, P. (2006) 'Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1 and Complement', *The Journal of Infectious Diseases*, 193, 1078–1088.

Avirutnan, P., Zhang, L., Punyadee, N., Manuyakorn, A., Puttikhunt, C., Kasinrer, W., Malasit, P., Atkinson, J.P. & Diamond, M.S. (2007) 'Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E', *PLOS Pathogens*, 3, e183.

Avšič-Županc, T., Poljak, M., Matičič, M., Radšel-Medvešček, A., LeDuc, J.W., Stiasny, K., Kunz, C. & Heinz, F.X. (1995) 'Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains', *Clinical and Diagnostic Virology*, 4, 51–59.

Balling, A., Beer, M., Gniel, D. & Pfeffer, M. (2015) '[Prevalence of antibodies against Tick-Borne Encephalitis virus in dogs from Saxony, Germany].', *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 128, 297–303.

Balmaseda, A., Stettler, K., Medialdea-Carrera, R., Collado, D., Jin, X., Zambrana, J.V., Jaconi, S., Cameroni, E., Saborio, S., Rovida, F., Percivalle, E., Ijaz, S., Dicks, S., Ushiro-Lumb, I., Barzon, L., Siqueira, P., Brown, D.W.G., Baldanti, F., Tedder, R., Zambon, M., de Filippis, A.M.B., Harris, E. & Corti, D. (2017) 'Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, 8384–8389.

Balmaseda, A., Zambrana, J.V., Collado, D., García, N., Saborío, S., Elizondo, D., Mercado, J.C., Gonzalez, K., Cerpas, C., Nuñez, A., Corti, D., Waggoner, J.J., Kuan, G., Burger-Calderon, R. & Harris, E. (2018) 'Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection', *Journal of Clinical Microbiology*, Edited by Y.-W. Tang, 56.

Balogh, Z., Egyed, L., Ferenczi, E., Bán, E., Szomor, K.N., Takács, M. & Berencsi, G. (2012) 'Experimental Infection of Goats with Tick-Borne Encephalitis Virus and the Possibilities to Prevent Virus Transmission by Raw Goat Milk', *Intervirology*, 55, 194–200.

Barrett, P.N., Dorner, F. & Plotkin, S.A. (1999) 'Tick-borne encephalitis vaccine', in *Vaccines*, WB Saunders Company Philadelphia, 767–780.

Barrows, N.J., Campos, R.K., Liao, K.-C., Prasanth, K.R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.-C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O.M., Bradrick, S.S. & Garcia-Blanco, M.A. (2018) 'Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses', *Chemical reviews*, 118, 4448–4482.

Bender, A., Schulte-Altedorneburg, G., Walther, E.U. & Pfister, H.-W. (2005) 'Severe tick borne encephalitis with simultaneous brain stem, bithalamic, and spinal cord involvement documented by MRI', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76, 135–137.

Bogovic, P. (2015) 'Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management', *World Journal of Clinical Cases*, 3, 430.

Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., Grard, G., Grimes, J.M., Hilgenfeld, R., Jansson, A.M., Malet, H., Mancini, E.J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G., Neyts, J., Owens, R.J., Ren, J., Selisko, B., Speroni, S., Steuber, H., Stuart, D.I., Unge, T. & Bolognesi, M. (2010) 'Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design', *Antiviral Research*, 87, 125–148.

Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X. & Rey, F.A. (2004) 'Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation', *The EMBO Journal*, 23, 728–738.

Brinton, M.A. (1986) 'Replication of Flaviviruses', in Schlesinger, S. and Schlesinger, M. J. (eds) *The Togaviridae and Flaviviridae*, Boston, MA: Springer New York (The Viruses), 327–374.

Bröker, M. & Kollaritsch, H. (2008) 'After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: Current positions about post-exposure treatment', *Vaccine*, 26, 863–868.

Caini, S., Szomor, K., Ferenczi, E., Gáspár, Á.S., Csohán, Á., Krisztalovics, K., Molnár, Z. & Horváth, J.K. (2012) 'Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011', *Eurosurveillance*, 17, 20128.

Caracciolo, I., Bassetti, M., Paladini, G., Luzzati, R., Santon, D., Merelli, M., Sabbata, G.D., Carletti, T., Marcello, A. & D'Agaro, P. (2015) 'Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in North-Eastern Italy', *Journal of Clinical Virology*, 69, 48–51.

Černý, J., Černá Bolfíková, B., Valdés, J.J., Grubhoffer, L. & Růžek, D. (2014) 'Evolution of Tertiary Structure of Viral RNA Dependent Polymerases', *PLoS ONE*, Edited by C. Dash, 9, e96070.

Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A.H., Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Hurtado-Monzon, A.M., Alcaraz-Estrada, S.L., Ludert, J.E. & Del Angel, R.M. (2015) 'Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells', *Virology*, 484, 113–126.

Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R. & Rice, C.M. (1990) 'Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication', *Annual Review of Microbiology*, 44, 649–688.

Chambers, T.J., Nestorowicz, A., Amberg, S.M. & Rice, C.M. (1993) 'Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication.', *Journal of virology*, 67, 6797–6807.

Chambouris, R., Sixl, W., Stünzner, D. & Köck, M. (1989) '[Antibodies in dogs to the virus of tick-borne encephalitis (early summer encephalomyelitis/tick-borne encephalitis) in Greece]', *Geographia medica. Supplement = Geographia medica. Sonderband*, 3, 11–14.

Chang, H.-H., Shyu, H.-F., Wang, Y.-M., Sun, D.-S., Shyu, R.-H., Tang, S.-S. & Huang, Y.-S. (2002) 'Facilitation of Cell Adhesion by Immobilized Dengue Viral Nonstructural Protein 1 (NS1): Arginine-Glycine-Aspartic Acid Structural Mimicry within the Dengue Viral NS1 Antigen', *The Journal of Infectious Diseases*, 186, 743–751.

Chen, J., Ng, M.M.-L. & Chu, J.J.H. (2015) 'Activation of TLR2 and TLR6 by Dengue NS1 Protein and Its Implications in the Immunopathogenesis of Dengue Virus Infection', *PLOS Pathogens*, Edited by R. J. Kuhn, 11, e1005053.

Chitimia-Dobler, L., Lemhöfer, G., Król, N., Bestehorn, M., Dobler, G. & Pfeffer, M. (2019) 'Repeated isolation of tick-borne encephalitis virus from adult *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Germany', *Parasites & Vectors*, 12, 90.

Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Sroka, J., Zając, V., Bilska-Zając, E., Chmurzyńska, E. & Dutkiewicz, J. (2012) 'Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus Antibodies in Domestic and Game Animals from Eastern Poland', *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56, 275–278.

Clarke, D.H. & Casals, J. (1958) 'Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 7, 561–573.

Cleton, N.B., van Maanen, K., Bergervoet, S.A., Bon, N., Beck, C., Godeke, G.-J., Lecollinet, S., Bowen, R., Lelli, D., Nowotny, N., Koopmans, M.P.G. & Reusken, C.B.E.M. (2017) 'A Serological Protein Microarray for Detection of Multiple Cross-Reactive Flavivirus Infections in Horses for Veterinary and Public Health Surveillance', *Transboundary And Emerging Diseases*, 64, 1801–1812.

Csángó, P.A., Blakstad, E., Kirtz, G.C., Pedersen, J.E. & Czettel, B. (2004) 'Tick-borne Encephalitis in Southern Norway', *Emerging Infectious Diseases*, 10, 533–534.

Czupryna, P., Moniuszko, A.M., Pancewicz, S.A., Grygorczuk, S.S., Kondrusik, M. & Zajkowska, J.M. (2011) 'Tick-borne encephalitis in Poland in years 1993-2008—epidemiology and clinical presentation. A retrospective study of 687 patients.', *European journal of neurology*, 18, 673–679.

Dai, X., Shang, G., Lu, S., Yang, J. & Xu, J. (2018) 'A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China', *Emerging Microbes & Infections*, 7, 1–9.

Danielová, V. & Holubová, J. (1991) 'Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks', *Modern acarology*, 2, 7–10.

Demicheli, V., Debalini, M.G. & Rivetti, A. (2009) 'Vaccines for preventing tick-borne encephalitis', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Edited by Cochrane Infectious Diseases Group.

Deubel, V., Crouser, J., Bénichou, D., Digoutte, J.-P., Bouloy, M. & Girard, M. (1983) 'Preliminary characterisation of the ribonucleic acid of yellow fever virus', *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie*, 134, 581–588.

Dobler, G., Erber, W. & Schmitt, H. (2019) 'Chapter 12c: Risk Map for TBEV – TBE Book'. Available at: <https://id-ea.org/tbe/chapter-12c-tbe-risk-map/> (accessed January 2020).

Dobler, G., Erber, W. & Schmitt, H.-J. (2018) *The TBE Book*, Global Health Press Pte Limited.

Dobler, G., Gniel, D., Petermann, R. & Pfeffer, M. (2012) 'Epidemiology and distribution of tick-borne encephalitis', *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 162, 230–238.

Donoso Mantke, O., Escadafal, C., Niedrig, M., Pfeffer, M. & on behalf of the Working group for, collective (2011) 'Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009', *Eurosurveillance*, 16.

Donoso-Mantke, O., S., L. & Ruzek, D. (2011) 'Tick-Borne Encephalitis Virus: A General Overview', in Ruzek, D. (ed.) *Flavivirus Encephalitis*, InTech.

Dorko, E., Hockicko, J., Rimárová, K., Bušová, A., Popadák, P., Popadáková, J. & Schréter, I. (2018) 'Milk outbreaks of tick-borne encephalitis in Slovakia, 2012-2016', *Central European Journal Of Public Health*, 26 Suppl, S47–S50.

Dörrbecker, B., Dobler, G., Spiegel, M. & Hufert, F.T. (2010) 'Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host', *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 213–222.

Dumler, J.S., Dotevall, L., Gustafson, R. & Granstrom, M. (1997) 'A Population-Based Seroepidemiologic Study of Human Granulocytic Ehrlichiosis and Lyme Borreliosis on the West Coast of Sweden', *The Journal of Infectious Diseases*, 175, 720–722.

Dumpis, U., Crook, D. & Oksi, J. (1999) 'Tick-Borne Encephalitis', *Clinical Infectious Diseases*, 28, 882–890.

Duscher, G.G., Wetscher, M., Baumgartner, R. & Walder, G. (2015) 'Roe deer sera used for TBE surveillance in Austria', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6, 489–493.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2012) *Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries*, Stockholm: ECDC [u.a.] (ECDC technical report).

Falconar, A.K.I. (1997) 'The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis', *Archives of Virology*, 142, 897–916.

Fan, W. & Mason, P.W. (1990) 'Membrane association and secretion of the Japanese encephalitis virus NS1 protein from cells expressing NS1 cDNA', *Virology*, 177, 470–476.

Fingerle, V., Goodman, J.L., Johnson, R.C., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G. & Wilske, B. (1997) 'Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups.', *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 3244–3247.

Frey, S. (2004) *Molekulare Charakterisierung der Epidemiologie von Zecken-übertragenen Enzephalitis Virus-Infektionen* (Dissertation, Veterinärbiologie), LMU München.

Fritz, R., Blazevic, J., Taucher, C., Pangerl, K., Heinz, F.X. & Stiasny, K. (2011) 'The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion', *Journal of Virology*, 85, 4377–4385.

Fritz, R., Orlinger, K.K., Hofmeister, Y., Janecki, K., Traweger, A., Perez-Burgos, L., Barrett, P.N. & Kreil, T.R. (2012) 'Quantitative comparison of the cross-protection induced by tick-borne encephalitis virus vaccines based on European and Far Eastern virus subtypes', *Vaccine*, 30, 1165–1169.

Gassmann, C. & Bauer, G. (1997) 'Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections', *Journal of Medical Virology*, 51, 242–251.

Gaunt, M.W., Sall, A.A., Lamballerie, X. de, Gould, E.A., Falconar, A.K.I. & Dzhivanian, T.I. (2001) 'Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography', *Journal of General Virology*, 82, 1867–1876.

Gelpi, E., Preusser, M., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F.X. & Budka, H. (2005) 'Visualization of Central European Tick-Borne Encephalitis Infection in Fatal Human Cases', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64, 506–512.

Gelpi, E., Preusser, M., Laggner, U., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F.X. & Budka, H. (2006) 'Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem brain tissue', *Journal of Neurovirology*, 12, 322–327.

Gerth, H.J., Grimshandl, D., Stage, B., Döller, G. & Kunz, C. (1995) 'Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus.', *Epidemiology and Infection*, 115, 355–365.

Gómez Martínez, C. (2014) 'Role of cervids and wild boar on the presence of tick-borne encephalitis virus in Sweden'. Available at: <https://stud.epsilon.slu.se/6626/> (accessed October 2019).

Gould, E.A., Buckley, A., Barrett, A.D.T. & Cammack, N. (1986) 'Neutralizing (54K) and Non-neutralizing (54K and 48K) Monoclonal Antibodies against Structural and Non-structural Yellow Fever Virus Proteins Confer Immunity in Mice', *Journal of General Virology*, 67, 591–595.

Gresíková, M. (1958) 'Excretion of the Tick-Borne Encephalitis Virus in the Milk of Subcutaneously Infected Cows.', *Acta Virologica*, 2, 188–92.

Gresikova, M., Weidnerova, K., Nosek, J. & Rajcani, J. (1972) 'Experimental pathogenicity of tick-borne encephalitis virus for dogs', *Acta virologica*.

Grgič-Vitek, M., Avšič-Županc, T. & Klavs, I. (2010) 'Tick-borne encephalitis after vaccination: Vaccine failure or misdiagnosis', *Vaccine*, 28, 7396–7400.

Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A. & Gould, E.A. (2003) 'Tick-borne encephalitis', *Antiviral Research*, (Viral Bioterrorism and Biodefence), 57, 129–146.

Günther, G., Haglund, M., Lindquist, L., Sköldenberg, B. & Forsgren, M. (1997) 'Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome', *Clinical and Diagnostic Virology*, 8, 17–29.

Günther, G., Haglund, M., Mesko, L., Bremmer, S., Lindquist, L., Forsgren, M., Sköldenberg, B. & Rudberg, U. (1998) 'Regional cerebral blood flow scintigraphy in tick-borne encephalitis and other aseptic meningoencephalitis', *Journal of Nuclear Medicine*, 39, 2055–2061.

Gustafson, R., Svenungsson, B., Forsgren, M., Gardulf, A. & Granström, M. (1992) 'Two-year survey of the incidence of lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in a high-risk population in Sweden', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 11, 894–900.

Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J.E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., Larquet, E., Charneau, P., Krey, T., Mégret, F., Guittet, E., Rey, F.A. & Flamand, M. (2011) 'Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 8003–8008.

Haglund, M., Forsgren, M., Lindh, G. & Lindquist, L. (1996) 'A 10-Year Follow-Up Study of Tick-Borne Encephalitis in the Stockholm Area and a Review of the Literature: Need for a Vaccination Strategy', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 28, 217–224.

Haglund, M. & Günther, G. (2003) 'Tick-borne encephalitis—pathogenesis, clinical course and long-term follow-up', *Vaccine*, (Tick-Borne Encephalitis: Virus, Disease, and Prevention), 21, S11–S18.

Hainz, U., Jenewein, B., Asch, E., Pfeiffer, K.-P., Berger, P. & Grubeck-Loebenstien, B. (2005) 'Insufficient protection for healthy elderly adults by tetanus and TBE vaccines', *Vaccine*, 23, 3232–3235.

Heininger, U., Bachtar, N.S., Bahri, P., Dana, A., Dodoo, A., Gidudu, J. & Santos, E.M. dos (2012) 'The concept of vaccination failure', *Vaccine*, 30, 1265–1268.

Heinz, F., Herzig, P., Asmera, J. & Benda, R. (1969) 'Comparison of the sensitivity of complement fixation tests, virus neutralization tests and the indirect immunofluorescence methods in the serologic diagnosis of tick-borne encephalitis', *Ceskoslovenska epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, 18, 193.

Heinz, F.X. (1986) 'Epitope Mapping of Flavivirus Glycoproteins', in Maramorosch, K., Murphy, F. A., and Shatkin, A. J. (eds) *Advances in Virus Research*, Academic Press, 103–168.

Heinz, F.X., Holzmann, H., Essl, A. & Kundi, M. (2007) 'Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis', *Vaccine*, 25, 7559–7567.

Hekrllová, A., Kubíček, O., Lány, P., Rosenbergová, K. & Schánilec, P. (2015) 'Tick-borne encephalitis in dogs: application of "nested real-time RT-PCR" for intravital virus detection.', *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 128, 397–401.

Hofmann, H., Kunz, C. & Heinz, F.X. (1991) 'Laboratory diagnosis of tick-borne encephalitis', in Calisher, C. H. (ed.) *Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Tick- and Mosquito-Borne Viruses*, Vienna: Springer (Archives of Virology Supplementum), 153–159.

Hofmann, H., Kunz, Ch., Heinz, F.X. & Dippe, H. (1983) 'Detectability of IgM antibodies against TBE virus after natural infection and after vaccination', *Infection*, 11, 164–166.

Holzmann, H. (2003) 'Diagnosis of tick-borne encephalitis', *Vaccine*, 21, S36–S40.

Holzmann, H., Aberle, S.W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E. & Heinz, F.X. (2009) 'Tick-borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria', *Emerging Infectious Diseases*, 15, 1671–1673.

Holzmann, H., Kundi, M., Stiasny, K., Clement, J., McKenna, P., Kunz, C. & Heinz, F.X. (1996) 'Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis', *Journal of Medical Virology*, 48, 102–107.

Holzmann, H., Vorobyova, M.S., Ladyzhenskaya, I.P., Ferenczi, E., Kundi, M., Kunz, C. & Heinz, F.X. (1992) 'Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes', *Vaccine*, 10, 345–349.

Hubálek, Z. & Rudolf, I. (2012) 'Tick-borne viruses in Europe', *Parasitology Research*, 111, 9–36.

Huzly, D., Hanselmann, I., Schmidt-Chanasit, J. & Panning, M. (2016) 'High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses', *Eurosurveillance*, 21.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (n.d.) 'ICTV Master Species List 2018b.v2', *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Available at: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/8266> (accessed December 2019).

Jacobs, M.R., Robinson, P.J., Bletchly, C., Mackenzie, J.M. & Young, P.R. (2000) 'Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosylphosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction', *The FASEB Journal*.

Jacobs, S.C., Stephenson, J.R. & Wilkinson, G.W.G. (1992) 'High-Level Expression of the Tick-Borne Encephalitis Virus NS1 Protein by Using an Adenovirus-Based Vector: Protection Elicited in a Murine Model', *J. VIROL.*, 66, 10.

Janitza-Futterer, D. (2003) *Serologische Untersuchungen zur endemischen Situation der Infektion mit dem FSME-Virus in einer südbadischen Pferde- und Hundepopulation* (Dissertation, Tiermedizin), LMU München.

Jeppesen, J.L. (1990) 'Home range and movements of free-ranging roe deer (*Capreolus capreolus*) at Kalø'.

Johnson, R.T. (1996) 'Acute Encephalitis', *Clinical Infectious Diseases*, 23, 219–224.

Kaiser, R. (1999) 'The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994–98A prospective study of 656 patients', *Brain*, 122, 2067–2078.

Kaiser, R. (2008) 'Tick-Borne Encephalitis', *Infectious Disease Clinics of North America*, (Tick-borne Diseases, Part II: Other Tick-borne Diseases), 22, 561–575.

Kaiser, R. (2016) '[Tick-borne encephalitis]', *Der Nervenarzt*, 87, 667–680.

Kaiser, R. & Holzmann, H. (2000) 'Laboratory Findings in Tick-Borne Encephalitis – Correlation with Clinical Outcome', *Infection*, 28, 78–84.

Kiffner, C., Vor, T., Hagedorn, P., Niedrig, M. & Rühle, F. (2012)

'Determinants of tick-borne encephalitis virus antibody presence in roe deer (*Capreolus capreolus*) sera', *Medical And Veterinary Entomology*, 26, 18–25.

Kirtz, G., Kölbl, S., Czettel, B. & Thalhammer, J.G. (2003) 'Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME, Zentral-europäische Zeckenenzephalitis) beim Hund in Österreich: eine Seroprävalenzstudie.[Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs in Austria: a seroprevalence study]', *Kleintierpraxis*, 48, 133–140.

Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schau, U., Moog, U., Hoffmann, B., Diller, R. & Süss, J. (2012) 'Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus--epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 3, 27–37.

Klaus, C., Beer, M., Saier, R., Schubert, H., Bischoff, S. & Süss, J. (2011) 'Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals', *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 124, 443–449.

Klaus, C., Gethmann, J., Hoffmann, B., Ziegler, U., Heller, M. & Beer, M. (2016) 'Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany', *Parasitology Research*, 115, 2729–2740.

Klaus, C., Hoffmann, B., Moog, U., Schau, U., Beer, M. & Süss, J. (2010) 'Can goats be used as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) in nonendemic areas? Experimental studies and epizootiological observations', *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 123, 441–445.

Klaus, C., Hörügel, U., Hoffmann, B. & Beer, M. (2013) 'Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations', *Veterinary Microbiology*, 163, 368–372.

Klaus, C., Ziegler, U., Kalthoff, D., Hoffmann, B. & Beer, M. (2014) 'Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera', *BMC Veterinary Research*, 10, 78.

Klimeš, J., Literák, I., Schánilec, P., Juřicová, Z. & Silva, E.T. e (2001) 'Prevalence of antibodies to tickborne encephalitis and West Nile flaviviruses and the clinical signs of tickborne encephalitis in dogs in the Czech Republic', *Veterinary Record*, 148, 17–20.

Kollaritsch, H., Paulke-Korinek, M., Holzmann, H., Hombach, J., Bjorvatn, B. & Barrett, A. (2012) 'Vaccines and vaccination against tick-borne encephalitis', *Expert Review of Vaccines*, 11, 1103–1119.

Kovalev, S.Y. & Mukhacheva, T.A. (2017) 'Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history', *Infection, Genetics and Evolution*, 55, 159–165.

Kristoferitsch, W., Stanek, G. & Kunz, C. (1986) 'Doppelinfection mit Frühsommermeningoencephalitis-(FSME-) Virus und *Borrelia burgdorferi*', *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 111, 861–864.

Kunz, C. (2003) 'TBE vaccination and the Austrian experience', *Vaccine*, (Tick-Borne Encephalitis: Virus, Disease, and Prevention), 21, S50–S55.

Kunz, C., Hofmann, H. & Dippe, H. (1971) 'Die Frühdiagnose der Frühsommermeningoencephalitis (FSME) im Hämagglutinationshemmungstest durch Behandlung des Serums mit 2-Mercaptoäthanol', *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 218, 273–279.

Kunz, Ch. & Krausler, J. (1964) 'Bildung und Überdauern der komplementbindenden Antikörper nach Infektionen mit Frühsommer-Meningoencephalitis (Tick-borne encephalitis) Virus', *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 14, 499–507.

Kunze, U. (2016) 'Tick-borne encephalitis—still on the map: Report of the 18th annual meeting of the international scientific working group on tick-borne encephalitis (ISW-TBE)', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7, 911–914.

Kunze, U., Asokliene, L., Bektimirov, T., Busse, A., Chmelik, V., Heinz, F.X., Hingst, V., Kadar, F., Kaiser, R., Kimmig, P., Kraigher, A., Krech, T., Linqvist, L., Lucenko, I., Rosenfeldt, V., Ruscio, M., Sandell, B., Salzer, H., Strle, F., Süss, J., Zilmer, K. & Mutz, I. (2004) 'Tick-borne encephalitis in childhood – Consensus 2004', *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 154, 242–245.

Labuda, M., Austyn, J.M., Zuffova, E., Kozuch, O., Fuchsberger, N., Lysy, J. & Nuttall, P.A. (1996) 'Importance of Localized Skin Infection in Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission', *Virology*, 219, 357–366.

Labuda, M., Kozuch, O., Zuffová, E., Elecková, E., Hails, R.S. & Nuttall, P.A. (1997) 'Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission between Ticks Cofeeding on Specific Immune Natural Rodent Hosts', *Virology*, 235, 138–143.

Labuda, M. & Nuttall, P.A. (2004) 'Tick-borne viruses', *Parasitology*, 129, S221–S245.

Lauer, G.M. & Walker, B.D. (2001) 'Hepatitis C Virus Infection', *New England Journal of Medicine*, 345, 41–52.

Lenhard, T., Ott, D., Jakob, N.J., Martinez-Torres, F., Grond-Ginsbach, C. & Meyding-Lamadé, U. (2018) 'Clinical outcome and cerebrospinal fluid profiles in patients with tick-borne encephalitis and prior vaccination history', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9, 882–888.

Lenhard, T., Ott, D., Jakob, N.J., Pham, M., Bäumer, P., Martinez-Torres, F. & Meyding-Lamadé, U. (2016) 'Predictors, Neuroimaging Characteristics and Long-Term Outcome of Severe European Tick-Borne Encephalitis: A Prospective Cohort Study', *PLOS ONE*, 11, e0154143.

Leonova, G.N. & Maistrovskaia, O.S. (1996) '[Viremia in patients with tick-borne encephalitis and in persons with attached ixodes ticks].', *Voprosy virusologii*, 41, 224–228.

Leschnik, M., Feiler, A., Duscher, G.G. & Joachim, A. (2013) 'Effect of owner-controlled acaricidal treatment on tick infestation and immune response to tick-borne pathogens in naturally infested dogs from Eastern Austria', *Parasites & Vectors*, 6, 62.

Leschnik, M.W., Benetka, V., Url, A., Pakozdy, A., Thaller, D., Bilek, A., Skerlak, R. & Möstl, K. (2008) 'Virale Enzephalitiden beim Hund in Österreich: diagnostische und epidemiologische Aspekte', 10.

Leschnik, M.W., Kirtz, G.C. & Thalhammer, J.G. (2002) 'Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs', *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 66–69.

Levanov, L., Vera, C.P. & Vapalahti, O. (2016) 'Prevalence estimation of tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in dogs from Finland using novel dog anti-TBEV IgG MAb-capture and IgG immunofluorescence assays based on recombinant TBEV subviral particles', *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7, 979–982.

Libraty, D.H., Young, P.R., Pickering, D., Endy, T.P., Kalayanarooj, S., Green, S., Vaughn, D.W., Nisalak, A., Ennis, F.A. & Rothman, A.L. (2002) 'High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever', *The Journal of Infectious Diseases*, 186, 1165–1168.

Lin, C., Amberg, S.M., Chambers, T.J. & Rice, C.M. (1993) 'Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site.', *Journal of Virology*, 67, 2327–2335.

Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (1997) 'trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication', *J. VIROL.*, 71, 10.

Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (2003) 'Molecular biology of flaviviruses', *Advances in virus research*, 59, 23–62.

Lindhe, K.E., Meldgaard, D.S., Jensen, P.M., Houser, G.A. & Berendt, M. (2009) 'Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in dogs from Denmark', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, 56.

Lindquist, L. & Vapalahti, O. (2008) 'Tick-borne encephalitis', *The Lancet*, 371, 1861–1871.

Litzba, N., Zelená, H., Kreil, T.R., Niklasson, B., Kühlmann-Rabens, I., Remoli, M.E. & Niedrig, M. (2014) 'Evaluation of Different Serological Diagnostic Methods for Tick-Borne Encephalitis Virus: Enzyme-Linked Immunosorbent, Immunofluorescence, and Neutralization Assay', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14, 149–159.

Logigian, E.L., Kaplan, R.F. & Steere, A.C. (1990) 'Chronic Neurologic Manifestations of Lyme Disease', *New England Journal of Medicine*, 323, 1438–1444.

Lu, Z., Bröker, M. & Liang, G. (2008) 'Tick-Borne Encephalitis in Mainland China', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8, 713–720.

Luckschander, L., Kölbl, S., Enzensberger, O., Zipko, H.T. & Thalhammer, J.G. (1999) 'Tick-borne encephalitis (TBE) in an austrian horse population.', *Tierärztliche Praxis*, 235–238.

Lundkvist, Å., Vene, S., Golovljova, I., Mavtchoutko, V., Forsgren, M., Kalnina, V. & Plyusnin, A. (2001) 'Characterization of tick-borne encephalitis virus from latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes', *Journal of Medical Virology*, 65, 730–735.

Lustig, Y., Zelena, H., Venturi, G., Van Esbroeck, M., Rothe, C., Perret, C., Koren, R., Katz-Likvornik, S., Mendelson, E. & Schwartz, E. (2017) 'Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile', *Journal of Clinical Microbiology*, Edited by A. J. McAdam, 55, 1894–1901.

Mackenzie, J.M., Jones, M.K. & Young, P.R. (1996) 'Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication', *Virology*, 220, 232–240.

Mantke, O.D., Schädler, R. & Niedrig, M. (2008) 'A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries'.

Marjelund, S., Tikkakoski, T., Tuisku, S. & Räsänen, S. (2004) 'Magnetic Resonance Imaging Findings and Outcome in Severe Tick-borne Encephalitis. Report of Four Cases and Review of the Literature', *Acta Radiologica*, 45, 88–94.

Marth, E. & Kleinhapl, B. (2001) 'Albumin is a necessary stabilizer of TBE-vaccine to avoid fever in children after vaccination', *Vaccine*, 20, 532–537.

Matile, H., Ferrari, E., Aeschlimann, A. & Wyler, R. (1981) 'Die Verbreitung der Zecken-Enzephalitis in der Schweiz', *Schw Med Wschr*, 111, 1262–1269.

Mázló, M. & Szántó, J. (1978) 'Morphological demonstration of the virus of tick-borne encephalitis in the human brain', *Acta Neuropathologica*, 43, 251–253.

Mickienė, A., Laiškonis, A., Günther, G., Vene, S., Lundkvist, Å. & Lindquist, L. (2002) 'Tickborne Encephalitis in an Area of High Endemicity in Lithuania: Disease Severity and Long-Term Prognosis', *Clinical Infectious Diseases*, 35, 650–658.

Mitchell, P.D., Reed, K.D. & Hofkes, J.M. (1996) 'Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic Ehrlichia species in residents of Wisconsin and Minnesota.', *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 724–727.

Mizutani, T., Yoshii, K., Takashima, I., Ivanov, L., Kariwa, H., Hayasaka, D., Goto, A. & Leonova, G.N. (2001) 'Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia', *Journal of General Virology*, 82, 1319–1328.

Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. (2010) *Molekulare Virologie*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Morozova, O.V., Bakhvalova, V.N., Potapova, O.F., Grishechkin, A.E., Isaeva, E.I., Aldarov, K.V., Klinov, D.V. & Vorovich, M.F. (2014) 'Evaluation of immune response and protective effect of four vaccines against the tick-borne encephalitis virus', *Vaccine*, 32, 3101–3106.

Muller, D.A. & Young, P.R. (2013) 'The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker', *Antiviral Research*, 98, 192–208.

Müller, K., König, M. & Thiel, H.J. (2006) '[Tick-borne encephalitis (TBE) with special emphasis on infection in horses]', *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 113, 147–151.

Munoz-Jordan, J.L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martinez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W.I. & Garcia-Sastre, A. (2005) 'Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses', *Journal of Virology*, 79, 8004–8013.

Nadelman, R.B., Horowitz, H.W., Hsieh, T., Wu, J.M., Aguero-Rosenfeld, M.E., Schwartz, I., Nowakowski, J., Varde, S. & Wormser, G.P. (1997) 'Simultaneous Human Granulocytic Ehrlichiosis and Lyme Borreliosis', *New England Journal of Medicine*, 337, 27–30.

Niedrig, M., Avsic, T., Aberle, S.W., Ferenczi, E., Labuda, M., Rozentale, B. & Donoso Mantke, O. (2007) 'Quality control assessment for the serological diagnosis of tick borne encephalitis virus infections', *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 38, 260–264.

Niedrig, M., Vaisviliene, D., Teichmann, A., Klockmann, U. & Biel, S.S. (2001) 'Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies', *Journal of Clinical Virology*, 20, 179–182.

Nosek, J. & Grulich, I. (1967) 'The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribeč Mountain range', *Bulletin of the World Health Organization*, 36, 31–47.

Nosek, J., Kozuch, O., Ernek, E. & Lichard, M. (1967) 'The importance of goats in the maintenance of tick-borne encephalitis virus in nature.', *Acta Virologica*, 11, 470–72.

Oksi, J., Viljanen, M.K., Kalimo, H., Peltonen, R., Marttila, R., Salomaa, P., Nikoskelainen, J., Budka, H. & Halonen, P. (1993) 'Fatal Encephalitis Caused by Concomitant Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus and *Borrelia burgdorferi*', *Clinical Infectious Diseases*, 16, 392–396.

Orlinger, K.K., Hofmeister, Y., Fritz, R., Holzer, G.W., Falkner, F.G., Unger, B., Loew-Baselli, A., Poellabauer, E.-M., Ehrlich, H.J., Barrett, P.N. & Kreil, T.R. (2011) 'A Tick-borne Encephalitis Virus Vaccine Based on the European Prototype Strain Induces Broadly Reactive Cross-neutralizing Antibodies in Humans', *The Journal of Infectious Diseases*, 203, 1556–1564.

Paulke-Korinek, M., Rendi-Wagner, P., Kundi, M., Laaber, B., Wiedermann, U. & Kollaritsch, H. (2009) 'Booster vaccinations against tick-borne encephalitis: 6 Years follow-up indicates long-term protection', *Vaccine*, 27, 7027–7030.

Pavlovsky, E.N. (1939) 'Natural focality of infectious and parasitic diseases', *Vestn Akad Nauk SSSR*, 10, 98–108.

Pavlovsky, E.N. (1966) 'Natural Nidality of Transmissible Diseases with special reference to the Landscape Epidemiology of Zooanthroponoses.', *Natural Nidality of Transmissible Diseases with special reference to the Landscape Epidemiology of Zooanthroponoses*.

Pfeffer, M. & Dobler, G. (2011) 'Tick-borne encephalitis virus in dogs - is this an issue?', *Parasites & Vectors*, 4, 59.

Piesman, J. & Beard, C.B. (n.d.) 'Prevention of Tick-Borne Diseases', 2.

Progen (2018) 'Progen Immunozyg FSME IgG ALL SPECIES ELISA'.

Puchhammer-Stöckl, E., Kunz, C., Mandl, C.W. & Heinz, F.X. (1995) 'Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay', *Clinical and Diagnostic Virology*, 4, 321–326.

Radda, A., Kunz, C.H., Hofmann, H. & Dippe, H. (1968) 'Nachweis von Antikörpern in Wildseren zur Erfassung von Herden des Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) in Niederösterreich', *Zentralbl Bakteriol Orig*, 208, 88–93.

Randolph, S.E. (2011) 'Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2, 179–182.

Rastogi, M., Sharma, N. & Singh, S.K. (2016) 'Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein', *Virology Journal*, 13.

Ratnasamy, N., Everett, E.D., Roland, W.E., McDonald, G. & Caldwell, C.W. (1996) 'Central Nervous System Manifestations of Human Ehrlichiosis', *Clinical Infectious Diseases*, 23, 314–319.

Reiner, B., Grasmuck, S., Steffen, F. & Djuric, N. (2002) 'Prevalence of TBE antibodies in serum and CSF of dogs with inflammatory and non-inflammatory CNS disease', *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 234.

Rice, C., Lenches, E., Eddy, Shin, S., Sheets, R. & Strauss, J. (1985) 'Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution', *Science*, 229, 726–733.

Rice, C.M., Strauss, E.G. & Strauss, J.H. (1986) 'Structure of the Flavivirus Genome', in Schlesinger, S. and Schlesinger, M. J. (eds) *The Togaviridae and Flaviviridae*, Boston, MA: Springer New York (The Viruses), 279–326.

Rieger, M.A., Nübling, M., Müller, W., Hasselhorn, H.-M. & Hofmann, F. (1999) 'Foxes as indicators for TBE endemicity — a comparative serological investigation', *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289, 610–618.

Rieille, N., Klaus, C., Hoffmann, D., Péter, O. & Voordouw, M.J. (2017) 'Goats as sentinel hosts for the detection of tick-borne encephalitis risk areas in the Canton of Valais, Switzerland', *BMC Veterinary Research*, 13.

Robert-Koch-Institut (2019a) 'RKI - FSME - Antworten auf häufig gestellte Fragen zur FSME-Impfung'. Available at: <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/FSME/FSME-Impfung/FSME-Impfung.html> (accessed December 2019).

Robert-Koch-Institut (2019b) 'Weitere Ausbreitung des West-Nil-Virus: Fünf Infektionen bei Pferden und erhöhte Fallzahlen bei Vögeln festgestellt'. Available at: https://www.fli.de/index.php?id=167&L=906&tx_news_pi1%5Bnews%5D=1196&tx_news_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx_news_pi1%5Baction%5D=detail&cHash=d9287d5d0155f0365c344fed47cca146 (accessed December 2019).

Robert-Koch-Institut, R. (2019a) 'Epidemiologisches Bulletin 43/2019', . Oktober, 10.

Robert-Koch-Institut, R. (2019b) 'Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018', 247.

Roelandt, S., Heyman, P., De Filette, M., Vene, S., Van der Stede, Y., Caij, A.B., Tavernier, P., Dobly, A., De Bosschere, H., Vyt, P., Meersschaert, C. & Roels, S. (2011) 'Tick-Borne Encephalitis Virus Seropositive Dog Detected in Belgium: Screening of the Canine Population as Sentinels for Public Health', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11, 1371–1376.

Roelandt, S., Suin, V., Stede, Y.V. der, Lamoral, S., Marche, S., Tignon, M., Saiz, J.C., Escibano-Romero, E., Casaer, J., Brochier, B., Gucht, S.V., Roels, S. & Vervaeke, M. (2016) 'First TBEV serological screening in Flemish wild boar', *Infection Ecology & Epidemiology*, 6, 31099.

Roggendorf, M., Deinhardt, F., Heinz, F. & Kunz, C.H. (1981) 'Serological diagnosis of acute tick-borne encephalitis by demonstration of antibodies of the IgM class', *Journal of Medical Virology*, 7, 41–50.

Rubel, F. & Schiffner-Rohe, J. (2019) *FSME in Deutschland: Stand der Wissenschaft*, Deutscher Wissenschafts-Verlag (DWV).

Rushton, J.O., Lecollinet, S., Hubálek, Z., Svobodová, P., Lussy, H. & Nowotny, N. (2013) 'Tick-borne Encephalitis Virus in Horses, Austria, 2011', *Emerging Infectious Diseases*, 19, 635–637.

Růžek, D., Dobler, G. & Donoso Mantke, O. (2010) 'Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications', *Travel Medicine and Infectious Disease*, 8, 223–232.

Růžek, D., Salát, J., Palus, M., Gritsun, T.S., Gould, E.A., Dyková, I., Skallová, A., Jelínek, J., Kopecký, J. & Grubhoffer, L. (2009) 'CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis', *Virology*, 384, 1–6.

Saksida, A., Duh, D., Lotrič-Furlan, S., Strle, F., Petrovec, M. & Avšič-Županc, T. (2005) 'The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis', *Journal of Clinical Virology*, 33, 331–335.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Cropp, C.B. & Monath, T.P. (1986) 'Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1.', *Journal of Virology*, 60, 1153–1155.

Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W. & Walsh, E.E. (1987) 'Protection of Mice Against Dengue 2 Virus Encephalitis by Immunization with the Dengue 2 Virus Non-structural Glycoprotein NS1', *Journal of General Virology*, 68, 853–857.

Schneider, H. (1931) 'Über epidemische acute "meningitis serosa"', *Wien. Klin. Wochenschr.*, 44, 350–352.

Schneider, H. (1932) *Die epidemische akute 'Meningitis serosa'*, Maudrich.

Schultze, D., Dollenmaier, G., Rohner, A., Guidi, T. & Cassinotti, P. (2007) 'Benefit of detecting tick-borne encephalitis viremia in the first phase of illness', *Journal of Clinical Virology*, 38, 172–175.

Schwaiger, M. & Cassinotti, P. (2003) 'Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA', *Journal of Clinical Virology*, 27, 136–145.

Sedlak, K., Zelena, H., Krivda, V. & Satran, P. (2014) 'Surveillance of West Nile fever in horses in the Czech Republic from 2011 to 2013', *EPIDEMIOLOGIE MIKROBIOLOGIE IMUNOLOGIE*, 307.

Sexton, D.J., Corey, G.R., Carpenter, C., Kong, L.Q., Gandhi, T., Breitschwerdt, E., Hegarty, B., Chen, S.M., Feng, H.M., Yu, X.J., Olano, J., Walker, D.H. & Dumler, S.J. (1998) 'Dual infection with Ehrlichia chaffeensis and a spotted fever group rickettsia: a case report.', *Emerging Infectious Diseases*, 4, 311–316.

Shapoval, A.N. (1977) '[Inapparent forms of tick-borne encephalitis]', *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii*, 11–17.

Shi, P.-Y. (2014) 'Unraveling a Flavivirus Enigma', *Science*, 343, 849–850.

Šikutová, S., Hornok, S., Hubálek, Z., Doležálková, I., Juřicová, Z. & Rudolf, I. (n.d.) 'Serological survey of domestic animals for tick-borne encephalitis, Bhanja viruses in northeastern Hungary', 17.

Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E.A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D.B., Stapleton, J.T. & ICTV Report Consortium (2017) 'ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae', *Journal of General Virology*, 98, 2–3.

Singh, V. & Somvanshi, P. (2009) 'Structural Modeling of the NS 3 helicase of Tick-borne encephalitis virus and their virtual screening of potent drugs using molecular docking', *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 1, 168–172.

Skarphéðinsson, S., Jensen, P.M. & Kristiansen, K. (2005) 'Survey of Tickborne Infections in Denmark', *Emerging Infectious Diseases*, 11, 1055–1061.

Slonim, D. & Hloucal, L. (1959) 'Production and Persistence of Complement-Fixing and Neutralizing Antibodies in Tick-Borne Encephalitis.', *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 175, 344–55.

Smith, G.W. & Wright, P.J. (1985) 'Synthesis of Proteins and Glycoproteins in Dengue Type 2 Virus-infected Vero and Aedes albopictus Cells', *Journal of General Virology*, 66, 559–571.

Song, H., Qi, J., Haywood, J., Shi, Y. & Gao, G.F. (2016) 'Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses', *Nature Structural & Molecular Biology*, 23, 456–458.

Sonnenberg, K., Niedrig, M., Steinhagen, K., Rohwäder, E., Meyer, W., Schlumberger, W., Müller-Kunert, E. & Stöcker, W. (2004) 'State-of-the-art serological techniques for detection of antibodies against tick-borne encephalitis virus', *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293, 148–151.

Spach, D.H., Liles, W.C., Campbell, G.L., Quick, R.E., Anderson Jr, D.E. & Fritsche, T.R. (1993) 'Tick-borne diseases in the United States', *New England Journal of Medicine*, 329, 936–947.

Steinhagen, K., Probst, C., Radzimski, C., Schmidt-Chanasit, J., Emmerich, P., van Esbroeck, M., Schinkel, J., Grobusch, M.P., Goorhuis, A., Warnecke, J.M., Lattwein, E., Komorowski, L., Deerberg, A., Saschenbrecker, S., Stöcker, W. & Schlumberger, W. (2016) 'Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016', *Eurosurveillance*, 21.

Stephenson, J.R., Crooks, A.J. & Lee, J.M. (1987) 'The Synthesis of Immunogenic Polypeptides Encoded by Tick-borne Encephalitis Virus', *Journal of General Virology*, 68, 1307–1316.

Stiasny, K., Holzmann, H. & Heinz, F.X. (2009) 'Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs', *Vaccine*, 27, 7021–7026.

Studahl, M., Lindquist, L., Eriksson, B.-M., Günther, G., Bengner, M., Franzen-Röhl, E., Fohlman, J., Bergström, T. & Aurelius, E. (2013) 'Acute Viral Infections of the Central Nervous System in Immunocompetent Adults: Diagnosis and Management', *Drugs*, 73, 131–158.

Süss, J. (2003) 'Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines', *Vaccine*, (Tick-Borne Encephalitis: Virus, Disease, and Prevention), 21, S19–S35.

Süss, J. (2011) 'Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2, 2–15.

Tipold, A., Fatzer, R. & Holzmann, H. (1993) 'Zentraleuropäische Zeckenzephalitis beim Hund', *Kleintierpraxis*, 38, 619–628.

Tkachev, S.E., Demina, T.V., Dzhioev, Yu.P., Kozlova, I.V., Verkhozina, M.M., Doroshchenko, E.K., Lisak, O.V., Bakhvalova, V.N., Paramonov, A.I. & Zlobi, V.I. (2011) 'Genetic Studies of Tick-Borne Encephalitis Virus Strains from Western and Eastern Siberia', in Ruzek, D. (ed.) *Flavivirus Encephalitis*, InTech.

Tonteri, E., Jääskeläinen, A.E., Tikkakoski, T., Voutilainen, L., Niemimaa, J., Henttonen, H., Vaheri, A. & Vapalahti, O. (2011) 'Tick-borne Encephalitis Virus in Wild Rodents in Winter, Finland, 2008–2009', *Emerging Infectious Diseases*, 17, 72–75.

Tonteri, E., Jokelainen, P., Matala, J., Pusenius, J. & Vapalahti, O. (2016) 'Serological evidence of tick-borne encephalitis virus infection in moose and deer in Finland: sentinels for virus circulation', *Parasites & Vectors*, 9.

Uchil, P.D. & Satchidanandam, V. (2003) 'Architecture of the Flaviviral replication complex protease, nuclease, and detergents reveal encasement within double-layered membrane compartments.', *Journal of Biological Chemistry*, 278, 24388–24398.

Valarcher, J.F., Hägglund, S., Juremalm, M., Blomqvist, G., Renström, L., Zohari, S., Leijon, M. & Chirico, J. (2015) 'Tick-borne encephalitis', *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 34, 453–466.

Venugopal, K., Reid, H.W. & Gould, E.A. (1994) 'Tick-borne flavivirus NS1 gene: identification of conserved peptides and antigenic analysis of recombinant louping ill virus NS1 protein', *Virus Research*, 31, 245–254.

Vor, T., Kiffner, C., Hagedorn, P., Niedrig, M. & Rühle, F. (2010) 'Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*)', *Experimental and Applied Acarology*, 51, 405–417.

Waldenström, J., Lundkvist, Å., Falk, K.I., Garpmo, U., Bergström, S., Lindegren, G., Sjöstedt, A., Mejlön, H., Fransson, T., Haemig, P.D. & Olsen, B. (2007) 'Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus', *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1215–1218.

Waldvogel, A., Matile, H., Wegmann, C., Wyler, R. & Kunz, C. (1981) 'Zeckenenzephalitis beim Pferd', *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*.

Waldvogel, K., Bossart, W., Huisman, T., Boltshauer, E. & Nadal, D. (1996) 'Severe tick-borne encephalitis following passive immunization', *European Journal of Pediatrics*, 155, 775–779.

Westaway, E.G. (1987) 'Flavivirus Replication Strategy', in Maramorosch, K., Murphy, F. A., and Shatkin, A. J. (eds) *Advances in Virus Research*, Academic Press, 45–90.

WHO (2011a) 'Background Document on Vaccines and Vaccination against Tickborne Encephalitis (TBE)'.

WHO (2011b) 'Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper.'

Winkler, G., Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E. & Stollar, V. (1988) 'Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer', *Virology*, 162, 187–196.

Xie, X., Gayen, S., Kang, C., Yuan, Z. & Shi, P.-Y. (2013) 'Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein', *Journal of Virology*, 87, 4609–4622.

Xing, Y., Schmitt, H.-J., Arguedas, A. & Yang, J. (2017) 'Tick-borne encephalitis in China: A review of epidemiology and vaccines', *Vaccine*, 35, 1227–1237.

Yamshchikov, V.F. & Compans, R.W. (1994) 'Processing of the intracellular form of the west Nile virus capsid protein by the viral NS2B-NS3 protease: an in vitro study.', *Journal of Virology*, 68, 5765–5771.

Young, P.R., Hilditch, P.A., Bletchly, C. & Halloran, W. (2000) 'An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients', *J. CLIN. MICROBIOL.*, 38, 5.

Zavadska, D., Anca, I., Andre, F., Bakir, M., Chlibek, R., Čížman, M., Ivaskeviciene, I., Mangarov, A., Mészner, Z., Pokorn, M., Prymula, R., Richter, D., Salman, N., Šimurka, P., Tamm, E., Tešović, G., Urbancikova, I. & Usonis, V. (2013) 'Recommendations for tick-borne encephalitis vaccination from the Central European Vaccination Awareness Group (CEVAG)', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9, 362–374.

IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CFA	Complement Fixation Assay, Komplementbindungsreaktion
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DC	Dendritic Cells, Dendritische Zellen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DENV	Dengue Virus
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
FLI	Friedrich-Löffler-Institut
FSME	Frühsommer Meningoenzephalitis
HCV	Hepatitis-C-Virus
HI	Hemagglutination Inhibition Test, Hämagglutinationshemmtest
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IIFA	Indirekt Immunofluorescence Assay, Indirekte Immunfluoresz
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NS1	Nicht-Strukturprotein 1
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug, Nichtsteroidale Antiphlogistika
NT	Neutralisationstest

ORF	Open-Reading-Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PRNT	Plaquereduktions-Neutralisationstest
RNA	Ribonukleinsäure
RSSE	Russischen Frühjahr-Sommer-Enzephalitis
RT-PCR	Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SMIA	Suspension Multiplex Immunoassay
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TBE	Tick-Borne Encephalitis
TBEV	Tick-Borne Encephalitis Virus
TBEV-Bkl	Baikal TBEV-Subtyp
TBEV-EU	Europäischer TBEV-Subtyp
TBEV-FE	Fernöstlicher TBEV-Subtyp
TBEV-Him	Himalaya TBEV-Subtyp
TBEV-Sib	Sibirischer TBEV-Subtyp
TLR	Toll-like Rezeptoren
UdSSR	Union der Sozialistischen Sowjetrepubliken
VBT	Vaccination Breakthrough, Impfdurchbruch
WNV	West-Nile-Virus
WV	Whole Virus
YFV	Yellow Fever Virus, Gelbfiebertvirus
ZNS	Zentralnervensystem

X. ANHANG

Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 1.

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
1	Yes	#NV	1280	2560	1.5506	0.53139113	positive
2	Yes	#NV	320	5120	1.09826667	0.53139113	positive
3	Yes	#NV	160	2560	1.0873	0.53139113	positive
4	Yes	#NV	320	320	0.25176667	0.53139113	positive
5	Yes	#NV	40	5120	1.67743333	0.53139113	positive
6	Yes	#NV	160	640	1.1045	0.53139113	positive
7	Yes	#NV	160	5120	1.74976667	0.4731	positive
8	Yes	#NV	80	>640 ^e	0.72853333	0.53139113	positive
9	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	0.77113333	0.53139113	positive
10	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	0.53316667	0.53139113	borderline
11	Yes	#NV	20	10240	1.07973333	0.53139113	positive
12	Yes	#NV	160	2560	1.9615	0.53139113	positive
13	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.09406667	0.53139113	positive
14	Yes	#NV	320	1280	1.74616667	0.52406116	positive
15	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.39273333	0.4731	positive
16	Yes	#NV	160	>1280 ^e	1.74016667	0.52406116	positive
17	Yes	#NV	2560	>10240 ^e	3.0991	0.4731	positive
18	Yes	#NV	160	>1280 ^e	2.57316667	0.4731	positive
19	Yes	#NV	640	5120	1.40443333	0.58503362	positive
20	Yes	#NV	640	640	1.92096667	0.52406116	positive
21	Yes	#NV	80	640	1.9856	0.52406116	positive
22	Yes	#NV	640	5120	2.39833333	0.58503362	positive
23	Yes	#NV	640	>1280 ^e	2.6928	0.52406116	positive
24	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.239	0.52406116	positive
25	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.59103333	0.52406116	positive
26	Yes	#NV	640	20480	3.137	0.4731	positive
27	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.6272	0.52406116	positive
28	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.8194	0.52406116	positive
29	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	3.11236667	0.4731	positive
30	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.57266667	0.4731	positive
31	Yes	#NV	160	640	2.2745	0.4731	positive
32	Yes	#NV	40	2560	0.2853	0.52406116	negative
33	Yes	#NV	20	1280	2.67943333	0.4731	positive
34	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	3.45483333	0.52406116	positive
35	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.99423333	0.4731	positive
36	Yes	#NV	160	10240	0.79406667	0.53139113	positive
37	Yes	#NV	160	20480	1.77013333	0.52406116	positive
38	Yes	#NV	>10 ^e	>2560 ^e	1.97183333	0.52406116	positive
39	Yes	#NV	320	640	1.02096667	0.52406116	positive
40	Yes	#NV	160	320	1.48943333	0.53139113	positive
41	Yes	#NV	160	320	2.2344	0.53139113	positive
42	Yes	#NV	320	81920	> 4,0 (NoCalc)	0.89760717	positive
43	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.82266667	0.60979505	positive
44	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	3.2356	0.60979505	positive
45	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.27473333	0.54773923	positive
51	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	3.07413333	0.54773923	positive

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders

^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.

^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)

^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.

^e titer greater than given number; not further titrated.

Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 1.

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
52	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.30046667	0.44142744	positive
53	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.60633333	0.44101383	positive
54	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.63996667	0.44101383	positive
55	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	0.85353333	0.54644776	positive
56	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	0.55866667	0.38904123	positive
57	Yes	#NV	<10	1280	1.32653333	0.38904123	positive
58	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	1.3703	0.54644776	positive
59	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	0.8026	0.46272068	positive
60	Yes	#NV	320	10240	3.70703333	0.4630907	positive
61	Yes	#NV	10	5120	2.0354	0.4630907	positive
62	Yes	#NV	40	>10240 ^e	3.67966667	0.4630907	positive
63	Yes	#NV	640	1280	1.58786667	0.4630907	positive
64	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.7338	0.4630907	positive
65	Yes	#NV	320	5120	1.6646	0.4630907	positive
66	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	2.43916667	0.4630907	positive
67	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	3.04436667	0.4630907	positive
68	Yes	#NV	>20 ^e	>80 ^e	3.5498	0.4630907	positive
69	Yes	#NV	>80 ^e	>1280 ^e	3.1918	0.59101566	positive
70	Yes	#NV	>80 ^e	>1280 ^e	2.93616667	0.59101566	positive
71	Yes	#NV	>80 ^e	>80 ^e	1.59996667	0.59101566	positive

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.^e titer greater than given number; not further titrated.

Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 2.

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
72	No	#NV	<10	<10	0.4474	0.53139113	negative
73	No	#NV	<10	<10	0.19873333	0.48135625	negative
74	No	#NV	<10	<10	1.44733333	0.53139113	positive
75	No	#NV	<10	<10	0.14356667	0.48135625	negative
76	No	#NV	<10	<10	0.06233333	0.48135625	negative
77	No	#NV	<10	<10	0.13823333	0.48135625	negative
78	No	#NV	<10	<10	0.2279	0.48135625	negative
79	No	#NV	<10	<10	0.14496667	0.48135625	negative
80	No	#NV	<10	<10	0.1595	0.48135625	negative
81	No	#NV	<10	<10	0.19833333	0.53139113	negative
82	No	#NV	<10	<10	0.10593333	0.48135625	negative
83	No	#NV	<10	<10	0.12086667	0.48135625	negative
84	No	#NV	<10	<10	0.12706667	0.48135625	negative
85	No	#NV	<10	<10	0.09156667	0.48135625	negative
86	No	#NV	<10	<10	0.17843333	0.48135625	negative
87	No	#NV	<10	<10	0.11666667	0.48135625	negative
88	No	#NV	<10	<10	0.118	0.48135625	negative
89	No	#NV	<10	<10	0.30636667	0.53139113	negative
90	No	#NV	<10	<10	0.1238	0.48135625	negative
91	No	#NV	<10	<10	0.13426667	0.48135625	negative
92	No	#NV	<10	<10	0.145	0.48135625	negative
93	No	#NV	<10	<10	0.11846667	0.48135625	negative
94	No	#NV	<10	<10	0.2379	0.53139113	negative
95	No	#NV	<10	<10	0.17403333	0.48135625	negative
96	No	#NV	<10	<10	0.20093333	0.48135625	negative
97	No	#NV	<10	<10	0.18396667	0.44142744	negative
98	No	#NV	<10	<10	0.1742	0.38904123	negative
99	No	#NV	<10	<10	0.28403333	0.38904123	negative
100	No	#NV	<10	<10	0.207	0.46272068	negative
101	No	#NV	<10	80	0.18483333	0.60289174	negative
102	No	#NV	<10	<10	0.0777	0.59101566	negative
103	No	#NV	<10	<10	0.37596667	0.59101566	negative
104	No	#NV	<10	<10	0.3407	0.59101566	negative
105	No	#NV	<10	<10	0.07823333	0.59101566	negative

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1, 2, 3, 5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.

Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 3.

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
106	No	#NV	<10 ^f	640	0.13713333	0.53139113	negative
107	No	80	<10 ^f	160	0.09316667	0.58499353	negative
108	No	#NV	<10 ^f	80	0.11956667	0.58499353	negative
109	No	20	<10 ^f	1280	0.1206	0.58499353	negative
110	No	0	<10 ^f	10	0.2011	0.53139113	negative
111	No	40	<10 ^f	2560	0.2209	0.58499353	negative
112	No	160	<10 ^f	2560	0.48753333	0.58499353	negative
113	No	10	<10 ^f	640	0.29486667	0.53139113	negative
114	No	#NV	<10 ^f	2560	0.4547	0.58499353	negative
115	No	#NV	<10 ^f	640	0.299	0.58499353	negative
116	No	80	<10 ^f	1280	0.21553333	0.58499353	negative
117	No	#NV	<10 ^f	640	0.1711	0.53139113	negative
118	No	#NV	<10 ^f	1280	0.3757	0.53139113	negative
119	No	#NV	<10 ^f	320	0.11963333	0.53139113	negative
120	No	#NV	<10 ^f	640	0.64913333	0.89760717	negative
121	No	#NV	<10 ^f	1280	0.59063333	0.89760717	negative
122	No	#NV	<10 ^f	1280	0.55066667	0.89760717	negative
123	No	#NV	<10 ^f	2560	0.3954	0.41605127	negative
124	No	#NV	<10 ^f	640	0.0758	0.54773923	negative
125	No	#NV	<10 ^f	1280	0.09553333	0.41605127	negative
126	No	#NV	<10 ^f	640	0.319	0.53139113	negative
127	No	#NV	<10 ^f	320	0.2579	0.53139113	negative
128	No	#NV	<10 ^f	640	0.43973333	0.62457981	negative
129	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.21336667	0.60979505	negative
130	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.16236667	0.60979505	negative
131	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.24396667	0.60979505	negative
132	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.1938	0.60979505	negative
133	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.12363333	0.60979505	negative
134	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.15003333	0.60979505	negative
135	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.1188	0.60979505	negative
136	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.38366667	0.60979505	negative
137	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.24156667	0.60979505	negative
138	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.1264	0.60979505	negative
139	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.2986	0.60979505	negative
140	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.16576667	0.60979505	negative
141	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.31323333	0.60979505	negative
142	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.14226667	0.60979505	negative
143	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.27303333	0.60979505	negative
144	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.1174	0.60979505	negative
145	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.1027	0.60979505	negative
146	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.40363333	0.60979505	negative
147	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.13036667	0.60979505	negative
148	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.57026667	0.60979505	negative

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titers are indicated. Group 4: DEN titers are indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.^e titer greater than given number; not further titrated.^f retroactively tested for complementary clarification

Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 3.

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
149	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.12626667	0.60979505	negative
150	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.22983333	0.60979505	negative
151	No	#NV	<10	>10 ^e	0.5082	0.62457981	negative
152	No	#NV	<10	>10 ^e	0.29476667	0.62457981	negative
153	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.60246667	0.62457981	negative
154	No	#NV	<10 ^f	>10 ^e	0.21476667	0.62457981	negative

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.^e titer greater than given number; not further titrated.^f retroactively tested for complementary clarification**Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 4.**

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
155	Yes	#NV	32000	80	0.28333333	0.48135625	negative
156	Yes	#NV	640	40960	2.04226667	0.48135625	positive
157	Yes	#NV	160	20480	0.23263333	0.48135625	negative
158	Yes	#NV	80	10240	0.25023333	0.48135625	negative
159	Yes	#NV	40	40960	0.2369	0.48135625	negative
160	Yes	#NV	80	163840	0.43343333	0.48135625	negative
161	Yes	#NV	640	80	0.13176667	0.48135625	negative
162	Yes	#NV	160	1280	0.13796667	0.48135625	negative
163	Yes	#NV	160	1280	0.19323333	0.48135625	negative
164	Yes	#NV	80	2560	0.08266667	0.47873662	negative

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.^e titer greater than given number; not further titrated.

Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 5.

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
165	No	#NV	20	<80	0.12206667	0.48135625	negative
166	No	#NV	320	640	0.14613333	0.48135625	negative
167	No	10	<10 ^f	640	0.3385	0.48135625	negative
168	No	40	<10 ^f	2560	0.24573333	0.48135625	negative
169	No	160	<10 ^f	320	0.41936667	0.48135625	negative
170	No	160	<10 ^f	2560	0.55203333	0.48135625	negative
171	No	20	<10 ^f	40	0.3349	0.48135625	negative
172	No	#NV	<10 ^f	2560	0.5238	0.48135625	borderline
173	No	#NV	<10 ^f	640	0.30526667	0.48135625	negative
174	No	#NV	<10 ^f	1280	0.5091	0.51401223	negative
175	No	#NV	<10 ^f	1280	0.1367	0.53139113	negative
176	No	#NV	<10 ^f	2560	0.2029	0.54743421	negative
177	No	#NV	<10 ^f	40	0.13223333	0.54773923	negative
178	No	#NV	<10 ^f	640	0.77686667	0.41605127	positive
179	No	#NV	<10 ^f	640	0.12066667	0.54773923	negative
180	No	#NV	<10 ^f	1280	0.55563333	0.41605127	positive
181	No	#NV	<10 ^f	1280	0.5368	0.48135625	positive
182	No	#NV	<10 ^f	640	0.43973333	0.62457981	negative
183	No	#NV	<10 ^f	10	0.1424	0.44101383	negative
184	No	#NV	<10 ^f	#NV	0.2408	0.48135625	negative

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.^e titer greater than given number; not further titrated.^f retroactively tested for complementary clarification**Supplementary TABLE - Characteristics of sera group 6.**

Case ID	Clinical symptoms ^a	NT titre	IFFA titre (IgM) ^b	IFFA titre (IgG) ^b	OD NS1 ELISA	Benchmark ^c	Result ^d
185	No	#NV	<10 ^f	640	2.09466667	0.61355609	positive
186	No	#NV	<10 ^f	80	0.65553333	0.61355609	borderline
187	No	#NV	<10 ^f	160 ^f	0.44046667	0.54773923	negative
188	No	#NV	<10	640	1.2802	0.47873662	positive

^a Fever, headache, photophobia, malaise; with or without neurological disorders^b IIFA was performed using the Flavivirus - Mosaic 1 (EUROIMMUN); Group 1,2,3,5 and 6: TBE titer is indicated. Group 4: DEN titer is indicated.^c Benchmark individually determined for every Test: mean value of the Cut-off control (YFC) plus one standard deviation (SD)^d OD below the mean value of the YFC plus one SD = negative; OD higher than the mean value of the YFC plus three SD = positive; OD in between = borderline.^f retroactively tested for complementary clarification.

XI. DANKSAGUNG

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Gerd Sutter und den Gutachtern für die Beurteilung dieser Arbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Mentor, Oberfeldarzt Prof. Dr. Gerhard Dobler, für seine Zeit, Geduld und Unterstützung bei der Wahl und Bearbeitung meines Promotionsthemas. Danke auch an Dr. Lidia Chitimia-Dobler für die Bereitstellung der Zeckenbilder, die moralische Unterstützung bei der Lösung von Problemen und die adäquate Versorgung mit Kaffee und Keksen.

Herzlichen Dank auch an den Leiter des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr, Oberstarzt PD Dr. Wölfel und seinen Vorgänger, Oberstarzt Prof. Dr. Zöller, für ihre Unterstützung und die Möglichkeit, meine Promotion an ihrem Institut bearbeiten zu können.

Danke an Oberstveterinär Prof. Dr. Meyer, der mich mit unermüdlicher Geduld und viel persönlichem Einsatz durch die bürokratischen Hürden der Bundeswehrverwaltung bis zu meiner Stelle am Institut begleitet hat und mir auch im Verlauf der Arbeit stets beratend zur Seite stand.

Vielen Dank an Oberfeldveterinär Dr. von Buttlar für sein wertvolles Konsil in allen immunologischen und ELISA-spezifischen Fragestellungen.

Herzlichen Dank auch an PD Dr. Borde für die Mitwirkung bei der Auswahl geeigneter Seren sowie seine große Hilfe bei der Erstellung des Papers.

Danke an Frau Dr. Zange und ihr Team vom Zentralbereich Diagnostik für die Unterstützung bei der Wahl und Vorcharakterisierung der verwendeten Seren.

Außerdem gilt besonderer Dank dem Team der Virologie, Sabine Schaper, Gitti Köhler und Oberfeldwebel Ramona Rieß für die technische und seelische Unterstützung im Labor.

Danke auch meinem Büromitbewohner, Major d.R. Peter Braun für die strategische und wissenschaftliche Beratung über die gesamte Promotionszeit und den Erhalt des Diploms für Kaffeezubereitung im Handfiltersystem.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, für ihre immerwährende Unterstützung im Studium und während der Promotion. Und ich danke meiner Perle dafür, dass sie es die ganze Zeit über mit mir ausgehalten hat und bereit war sich alle meine wissenschaftlichen und weniger wissenschaftlichen Überlegungen zu jeder Tageszeit (mit stets großem Interesse) anzuhören.